

**Untersuchungen zum Fließgleichgewicht
und zur Funktion des Cytochrom-b₅-Systems**

Stefan Karl Maria Hülsmann

1977

Untersuchungen zum Fließgleichgewicht
und zur Funktion des Cytochrom-b₅-Systems

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Stefan Karl Maria Hülsmann

München 1977

**Aus dem Institut für Physiologische Chemie und Physikalische
Biochemie der Universität München**

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher

Prof. Dr. E. M. Klingenberg

Prof. Dr. H. G. Zachau

1. Berichterstatter: Priv.Doiz. Dr. B. Brauser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 5. 1977

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. B. Brauser für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung im Laufe dieser Arbeit.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. A. Schwab für die unermüdliche Bereitwilligkeit zu fruchtbaren Diskussionen.





INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIALIEN UND METHODEN	6
2.1	<u>Abkürzungen und Definitionen</u>	6
2.2	<u>Materialien</u>	7
2.3	<u>Tests</u>	9
2.3.1	Säurestop	9
2.3.2	NADH-Messung	9
2.3.3	Pyruvat-Test, Oxalacetat-Test	9
2.3.4	Malat-Test, Lactat-Test	9
2.3.5	LDH-Test	9
2.3.6	Cytochrom-b ₅ -Reduktase-Test	10
2.3.7	Flavin-Messung	10
2.3.8	Cyt.b ₅ -Test	11
2.3.9	Cyt.P ₄₅₀ -Test	11
2.4	<u>Proteinbestimmung</u>	12
2.5	<u>Chromatographie-Methoden</u>	12
2.6	<u>SDS-Gelelektrophorese</u>	13
2.7	<u>Präparationen</u>	13
2.7.1	Präparation von Mikrosomen	13
2.7.2	Isolierung von Lactatdehydrogenase	14
2.7.3	Isolierung von try-b ₅	17
2.7.4	Isolierung von det-b ₅	19
2.7.5	Isolierung von lys-Reduktase	21
2.7.6	Anreicherung von det-Reduktase	23
2.8	<u>Potentiometrische Titration mit der Platin-Elektrode</u>	25
2.9	<u>Sauerstoffmessung</u>	25
2.10	<u>Geräte zur Spektralphotometrie</u>	28
2.11	<u>Standardredoxpotentiale</u>	29
2.11.1	Standardredoxpotential von NADH/NAD	29
2.11.2	Standardredoxpotential von Lactat/Pyruvat	30
2.11.3	Standardredoxpotential von Malat/Oxalacetat	31
2.12	<u>Anaerobe Titrations mit Glucoseoxidase</u>	31
2.13	<u>Durchführung der Redox titrationen</u>	32
2.13.1	Das Prinzip der Redox titration	32
2.13.2	Reversibilität	33
2.13.3	Kontrolle der Reduktionsgrade 100% und 0 %	34
2.13.4	Kontrolle der Substratspiegel	34
2.14	<u>Computerprogramm zur Simulation des Enzymsystems</u>	35
3	EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE	37
3.1	<u>Charakterisierung der Präparationen</u>	37
3.1.1	Mikrosomen	37
3.1.2	Lactatdehydrogenase	37
3.1.3	try-b ₅	38
3.1.4	det-b ₅	39
3.1.5	lys-Reduktase	41
3.1.6	det-Reduktase	43

3.2	<u>Die Michaeliskonstanten und Maximalgeschwindigkeiten der Reduktase/Cyt.b₅-Reaktion und der Autoxidation</u>	45
3.2.1	Die Reaktion lys-Reduktase-try-b ₅	45
3.2.2	Die Autoxidationsreaktionen	46
3.2.2.1	lys-Reduktase	46
3.2.2.2	Cyt.b ₅	48
3.2.2.3	Katalase-Zugabe und Stöchiometrie NADH:Sauerstoff	49
3.3	<u>Das Redoxverhalten der Komponenten des Cyt.b₅-Systems in Anoxie</u>	51
3.3.1	Notwendigkeit der quantitativen Sauerstoffentfernung	51
3.3.2	Oxidierende Äquivalente in Oxalacetat- und Pyruvat-lösung	52
3.3.3	Das Redoxverhalten der lys-Reduktase	54
3.3.3.1	Reduktion des Flavins mit NADH/NAD	54
3.3.3.2	Das Mittelpotential der Reduktase bei Titration mit Lactat/Pyruvat und Malat/Oxalacetat	55
3.3.3.3	Kinetik der Flavinreduktion	57
3.3.3.4	Die pH-Abhängigkeit des Mittelpotentials der Reduktase	59
3.3.4	Das Redoxverhalten des Cyt.b ₅	60
3.3.4.1	Redoxtitration und Reduktionskinetik des mikrosomalen Cyt.b ₅	60
3.3.4.2	Redoxtitration und Reduktionskinetik des isolierten Cyt.b ₅	63
3.4	<u>Potentiometrische Titration des Cyt.b₅</u>	65
3.5	<u>Das Redoxverhalten der Komponenten des aeroben Cyt.b₅-Systems</u>	67
3.5.1	Redoxtitrationen von NAD mit Lactat/Pyruvat	67
3.5.2	Das scheinbare Mittelpotential des mikrosomalen Cyt.b ₅	68
3.5.3	Das Redoxverhalten der isolierten Cyt.b ₅ -Reduktase	72
3.5.3.1	Das scheinbare Mittelpotential der Reduktase	72
3.5.3.1.1	Redoxtitrationen mit Malat/Oxalacetat	72
3.5.3.1.2	Redoxtitrationen mit Lactat/Pyruvat	74
3.5.3.2	Abhängigkeit des Reduktionsgrades von der NAD-Konzentration bei konstantem E _{L/P}	77
3.5.3.3	pH-Abhängigkeit des scheinbaren Mittelpotentials der Reduktase	78
3.5.4	Das Redoxverhalten des isolierten Cyt.b ₅	79
3.5.4.1	Stöchiometrie der Reduktion mit NADH/NAD	79
3.5.4.2	Das scheinbare Mittelpotential des Cyt.b ₅	80
3.5.4.2.1	Redoxtitrationen der Kombination lys-Reduktase/try-b ₅	80
3.5.4.2.2	Redoxtitrationen der Kombination det-Reduktase/det-b ₅	86
3.5.4.3	Redoxtitrationen des mikrosomalen und isolierten Cyt.b ₅ mit Lactat/Pyruvat in Gegenwart von NADPH	88
4	<u>DIE SIMULATION DES CYT.B₅-SYSTEMS AM KINETISCHEN MODELL</u>	90
4.1	<u>Die Aufstellung des kinetischen Modells</u>	90
4.1.1	Die Dehydrogenase-Reaktion	90
4.1.1.1	LDH	90
4.1.1.2	MDH	95
4.1.2	Die Cyt.b ₅ -Reduktase-Reaktion	96
4.1.2.1	Ordered Bi Uni Uni Bi 'doppelter Thorell Chance'-Mechanismus	97
4.1.2.2	Random-Mechanismus	99

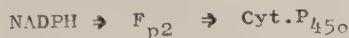
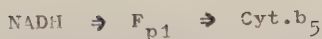
4.1.2.7	Hexa Uni Ping Pong-Mechanismus	100
4.1.3	Die Autoxidation	103
4.1.3.1	NADH	105
4.1.3.2	Cyt. b_5 -Reduktase	105
4.1.3.3	Cyt. b_5	106
4.2	<u>Computer-Simulation der Redoxtitration</u>	107
4.2.1	<u>Simulation der Reduktasetitrationsen</u>	109
4.2.1.1	Abhängigkeit der aeroben und anaeroben Titration von der Reduktase-Konzentration	109
4.2.1.2	Simulation der aeroben $E_{L/P}$ -Titration in Abhängigkeit von Konzentrationen und Geschwindigkeitskonstanten	115
4.2.1.3	Veränderung der NAD-Konzentration bei konstantem $E_{L/P}$	117
4.2.1.4	Anaerobe Reduktionskinetik	121
4.2.2	<u>Simulation des anaeroben und aeroben Cyt.b_5-Systems</u>	122
4.2.2.1	Die anaeroben und aeroben Redoxtitrationen des Cyt. b_5	122
4.2.2.2	Die Abhängigkeit der aeroben Cyt. b_5 -Titration von den Konzentrationen und Geschwindigkeitskonstanten	128
4.2.2.3	Abhängigkeit des Cyt. b_5 -Reduktionsgrades von der NAD-Konzentration bei konstantem $E_{L/P}$	135
4.2.2.4	Anaerobe Reduktionskinetik des Cyt. b_5	137
4.2.3	Das Potentialgefälle in der Redoxkette	139
4.3	<u>Vergleich der experimentellen Titration mit dem simulierten Modell</u>	141
4.3.1	Cyt. b_5 -Reduktase	141
4.3.2	Cyt. b_5	143
4.3.3	Anaerobe Reduktionskinetik	145
5	<u>ZUR FUNKTION DES CYT.b_5-SYSTEMS MIT PHYSIOLOGISCHEN UND XENOBIOTISCHEN SUBSTRATEN</u>	146
5.1	<u>Die Monadion-katalysierte Atmung</u>	146
5.1.1	Mikrosomen	146
5.1.2	lys-Reduktase	148
5.1.3	lys-Reduktase + try- b_5	149
5.2	<u>Die Peroxidase-Aktivität des Cyt.b_5</u>	152
5.2.1	Mikrosomen von nicht-vorbehandelten Ratten	153
5.2.2	Mikrosomen von mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten	154
5.2.3	Isoliertes System lys-Reduktase + try- b_5	155
5.3	<u>Die Reaktion des Cyt.b_5 mit o-Diphenolen</u>	158
5.3.1	2-Hydroxy-Ostradiol	158
5.3.2	Isoproterenol	160
5.3.2.1	Hemmung der mikrosomalen NADPH-abhängigen Cyt. b_5 -Reduktion	160
5.3.2.2	Stöchiometrie Sauerstoff: NADPH:Isoproterenol bei der Isoproterenol-Oxidation durch die NADPH-Cyt. b_5 -Reduktase	161
5.3.2.3	Die Oxidation des isolierten Cyt. b_5 durch Isoproterenol	164
5.3.2.4	Die Hemmung der NADPH-abhängigen Isoproterenol-Oxidation durch das Cyt. b_5 -System	165

6	DISKUSSION	167
6.1	<u>Das Mittelpotential des isolierten Cyt.b₅</u>	167
6.1.1	Das 'wahre Mittelpotential' E ^o	167
6.1.2	Das 'scheinbare Mittelpotential' E _a	168
6.2	<u>Das Mittelpotential der Cyt.b₅-Reduktase</u>	171
6.3	<u>Die pH-Abhängigkeit des E_a und E_o</u>	172
6.4	<u>Die 'scheinbaren Mittelpotentiale' des isolierten Cyt.b₅-Systems im Vergleich zu den Mikrosomen</u>	173
6.5	<u>Die Form der aeroben Titrationskurve</u>	176
6.6	<u>Die kinetischen Parameter und das Reaktionsmodell der isolierten Cyt.b₅-Reduktase-Reaktion</u>	178
6.7	<u>Zur Aussagefähigkeit der Simulation</u>	181
6.8	<u>Die Bedeutung des Autoxidationsflusses und der Redoxzustand des Cyt.b₅ in vitro und in vivo</u>	181
6.9	<u>Das Lactat/Pyruvat-Potential als Redox-Indikator des cytosolischen NADH/NAD-Potentials</u>	185
6.10	<u>Zum Mechanismus der Autoxidation</u>	189
6.11	<u>Die Reaktion des Cyt.b₅-Systems mit Menadion</u>	191
6.12	<u>Die peroxidatische Aktivität des Cyt.b₅</u>	193
6.13	<u>Die Reaktion des Cyt.b₅ mit o-Diphenolen</u>	196
6.13.1	2-Hydroxy-Ostradiol	196
6.13.2	Isoproterenol	197
6.14	<u>Die Reaktionen des Cyt.b₅ als 'Entkopplungen des Elektronenflusses' und die Interaktion mit Cyt.P₄₅₀</u>	200
7	ZUSAMMENFASSUNG	203
8	LITERATURVERZEICHNIS	207
9	LEBENS LAUF	214

EINLEITUNG

Eine Grundlage des Phänomens Leben besteht in der Aufrechterhaltung von Ungleichgewichten, denn lebende Materie als ein offenes System verschafft sich die zur Existenz nötige Energie aufgrund des dauernden Flusses von Energieträgern über ihre Systemgrenzen. Im geschlossenen System stellt sich zwischen den Partnern von Redoxreaktionen ein thermodynamisches Gleichgewicht ein, das Verhältnis ihrer Konzentrationen steht im gesetzmässigen Zusammenhang mit dem Unterschied ihrer Standard-Redoxpotentiale, wie es die NERNST-Gleichung formuliert. Die einzelnen Potentiale der jeweiligen Reaktanten sind gleich. Im offenen System der lebenden Zelle werden die Gleichgewichte nicht erreicht. Es herrscht ein Fliessgleichgewicht und die Potentiale weichen von denen des thermodynamischen Gleichgewichts ab. Dies kann verglichen werden mit einer Batterie, die an die Zelle angelegt ist, wobei reduzierende Äquivalente (Elektronen) vom negativen Pol (H_2) zum positiven Pol (O_2) fliessen mit einer bestimmten Stromstärke (Flussgrösse) und Spannung (Potentialdifferenz), aus deren Produkt sich die Leistung des Systems bestimmt. Die Gesamtpotentialdifferenz (das 'Potential') besteht aus der Summe der Potentialdifferenzen der einzelnen Glieder der gesamten metabolischen Kette, und es besteht analog dem Ohmschen Gesetz auch eine proportionale Abhängigkeit zwischen Fluss und Auslenkung aus dem Gleichgewicht, d.h. zwischen Stromstärke und Potential. Je nach metabolischem Geschehen in der Zelle verändert sich der Fluss und das Redoxpotential. Als wichtigste Intermediate des Energiestoffwechsels, als 'Drehscheibe' der reduzierenden Äquivalente zwischen Energieträgern und Energieverbrauchern und damit als

regulatorisches Element fungieren die Hydrid-Ionen-übertragenden Nukleotide NAD und NADP. Die Frage nach den Redoxpotentialen dieser zentralen 'Kosubstrate' in der lebenden Zelle ist daher von besonderer Bedeutung für das Verständnis des biochemischen Geschehens. Sie wird seit etwa 20 Jahren vor allem in den Arbeitskreisen von KREBS, HOLZER und BÜCHER bearbeitet. Die in dieser Zeit erzielten Ergebnisse sind nicht ohne Widersprüche. Diese hängen einerseits mit den methodischen Schwierigkeiten zusammen, die sowohl der invasiven Methodik (Bestimmung der Redoxpotentiale aus den Substratspiegeln gefriergestoppeter Organe) als auch der nicht-invasiven Methodik (Fluoreszenz- und Absorptionsphotometrie intakter isolierter Organe) anhaften. Andererseits birgt prinzipiell die indirekte Messung der Redoxpotentiale von Reaktanten im Fliessgleichgewicht Fehlerquellen aufgrund der flussabhängigen Abweichung vom Gleichgewichtspotential. Dies ist bedeutungsvoll für die Bestimmung des cytosolischen NADH-Redoxpotentials durch Messung der Lactat- und Pyruvat-Konzentrationen als Indikatoren im Perfusat der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber. Die Substrate permeieren die Zellmembran und es wird postuliert, dass sich zwischen extra- und intrazellulärem Lac/Pyr-Verhältnis über die cytosolische Lactatdehydrogenase ein thermodynamisches Gleichgewicht einstellt und damit auch ein Gleichgewicht zwischen extrazellulärem Lac/Pyr und intrazellulärem NADH. An das cytosolische NADH-Potential gekoppelt ist u.a. auch das mikrosomale Cytochrom b_5 . Mikrosomen sind die bei der Fraktionierung der aufgeschlossenen Zellen anfallenden Vesikel des endoplasmatischen Retikulums, eines Membransystems. Sie enthalten zwei Elektronentransportsysteme, beide bestehend aus je einem Flavoprotein und einem Cytochrom, die NAD- bzw. NADP-abhängig sind.



F_{p1} : NADH-Cyt. b_5 -Reduktase

F_{p2} : NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase

Ein Austausch von reduzierenden Äquivalenten ist auf der Stufe der Flavine möglich. Die Funktion des P_{450} -Systems ist intensiv untersucht, sie steht im Dienst des 'Drug metabolism', und man kennt oxidative Reaktionen (Hydroxylierungen von Aromaten und Alkylketten, oxidative Dealkylierungen, N-Oxidationen, Sulphoxidationen, Epoxidation) und reduktive Reaktionen (Reduktion von Nitro- und Azo- zu Amino-Gruppen, von Peroxiden und Ketonen zu Alkoholen). Demgegenüber ist von der Funktion des Cyt. b_5 vor allem die durch Cyanid-Ionen hemmbare Desaturase-Reaktion untersucht, durch die Doppelbindungen in gesättigte Fettsäuren eingeführt werden. Von den weiteren Aufgaben des Cyt. b_5 ist wenig bekannt, in der Diskussion steht zur Zeit aufgrund eines synergistischen Effektes des NADH bei einigen P_{450} -abhängigen Reaktionen die 'Einspeisung des zweiten Elektrons' vom Cyt. b_5 in den Komplex [P_{450} -Substrat-aktivierter Sauerstoff]. Hinweise auf die Funktion des Cyt. b_5 sollten sich ergeben durch Beobachtung des steady-state-Reduktionsgrades bei verschiedenen metabolischen Bedingungen. Normalerweise zu 100% reduziert, lässt es sich oxidieren im intakten Organ durch dessen Perfusion mit Menadion und Ferricyanid, in isolierten Hepatocyten durch Zugabe von Cumolhydroperoxid, und in Mikrosomen durch Menadion, organische Peroxide, o-Diphenolen und einige weitere Substrate des Cyt. P_{450} -Systems. Alle diese Substanzen erhöhen den Fluss teils des NADH, teils des NADPH und verändern somit die cytosolischen Nukleotidpotentiale. Die

einigen bisher bestimmten Flüsse durch das Cyt.b₅ sind $v_{\max} = 1 - 1.5 \text{ nMol NADH/min/nMol Cyt.b}_5$ im Falle des 'synergistischen Effektes' und ca. $5 \text{ nMol NADH/min/nMol Cyt.b}_5$ im Falle der Desaturase-Aktivität bei Substratsättigung, unter physiologischen Substratkonzentrationen noch geringer. Diese Flüsse sind sehr niedrig im Vergleich zu dem durch die mitochondriale Endoxidase, der sich bei einem Gehalt der Leber von 5- 10 nMol Cyt.a/a₃/g und einer Cyanid-hemmbareren Atmung der Leber von $1.2 \text{ uMol O}_2/\text{min/g}$ auf etwa 600 nMol reduzierende Äquivalente/min/nMol Cyt.a/a₃ berechnen lässt. In Anbetracht dieser geringen Flüsse durch das Cyt.b₅, sowie der bisher widersprüchlichen Messungen des Cyt.b₅-Mittelpotentials, stellt sich die Frage, ob das Cyt.b₅-System ein 'near on equilibrium'-System ist oder vielmehr ein 'far from equilibrium'-System. Im ersteren Falle ist das Cyt.b₅ ein Redox-Indikator für das cytosolische NADH-Potential und sein Mittelpotential könnte negativer sein als bisher angenommen. Im zweiten Falle repräsentiert die beobachtete Cyt.b₅-Oxidation das Fließgleichgewicht des Systems mit den beiden prinzipiellen Möglichkeiten: verminderter Zufluss ohne direkte Beteiligung oder vermehrter Abfluss reduzierender Äquivalente unter Beteiligung des Cyt.b₅-Systems an der Metabolisierung.

Die in dieser Arbeit angegangenen Fragen lauten also:

1. Ist das Lactat/Pyruvat- bzw. Cyt.b₅-Potential ein Redoxindikator des cytolischen NADH-Potentials?

a) Welches sind die Standard-Redoxpotentiale von

Cyt.b₅-Reduktase und Cyt.b₅?

b) Welches sind die kinetischen Eigenschaften des gekoppelten LDH-Cyt.b₅-Systems und die der Einzelreaktionen?

- c) Welche Bedeutung hat die Flussgrösse auf die Abweichung der Potentiale vom Gleichgewicht?
- d) Wie wird das 'scheinbare Mittelpotential' des Cyt.b₅ im Fliessgleichgewicht durch die Veränderung der Konzentrationen der übrigen Komponenten verändert?
- 2. Besteht eine direkte Beteiligung des Cyt.b₅-Systems an der Metabolisierung von Menadion, Hydroperoxiden und o-Diphenolen?
- 3. Welche Bedeutung hat die Autoxidation für den Fluss und die Funktion des Cyt.b₅-Systems?

Zur Klärung dieser Probleme soll die Isolierung des membrangebundenen Cyt.b₅-Systems mit Proteasen und Detergens und die in vitro-Rekonstitution mit den Redox-Systemen Lactat/Pyruvat und Malat/Oxalacetat sowie der Vergleich mit dem Verhalten der isolierten Mikrosomen beitragen.

2 MATERIALEN UND METHODEN

2.1 Abkürzungen und Definitionen

GCD	Glucoseoxidase, β -D-Glucose: oxygen 1-oxido-reductase EC 1.1.3.4
LDH	Lactatdehydrogenase, L-Lactate: NAD oxido-reductase EC 1.1.1.27
Kat	Katalase, Hydrogenperoxid: hydrogenperoxid-oxidoreductase EC 1.11.1.6
MDH	Malatdehydrogenase, L-Malat: NAD oxido-reductase EC 1.1.1.37
b ₅ -Reduktase	NADH: cytochrome b ₅ -oxidoreductase EC 1.6.2.2
lys-Reduktase	Cyt.b ₅ -Reduktase mit Hilfe von Lysosomen isoliert
det-Reduktase	Cyt.b ₅ -Reduktase mit Hilfe von Detergens isoliert
P ₄₅₀ -Reduktase	NADPH: cytochrome P ₄₅₀ -Oxidoreductase EC 1.6.99.2
Try	Trypsin EC 3.4.21.4
try-b ₅	Cyt.b ₅ mit Hilfe von Trypsin isoliert
det-b ₅	Cyt.b ₅ mit Hilfe von Detergens isoliert
AS	Ammoniumsulfat
BOOH	t-Butylhydroperoxid
COOH	Cumolhydroperoxid
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamin-Tetracetat
FeCy	TrikaliumHexacyanoferrat-III, Ferricyanid
ME	Mercaptoäthanol
MON	Menadion
NAD	β -Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	reduziertes NAD
NADP	β -Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes NADP
NINAC	N-Isopropyl-Noradrenochrom
TRAP	Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid-Puffer

Einheit der Enzymaktivität: 1 Unit = 1 μ Mol Substrat/min
 Substrat ist bei Reduktasen der Elektronenakzeptor.
 Die Konzentrationsangaben von LDH und MDH beziehen sich
 auf NADH-Bindungsstellen (b.s., binding sites), wobei
 LDH 4 und MDH 2 b.s./molekül besitzen.

E_o Mittelpotential, Standardredoxpotential bei pH 0
 E'_o Mittelpotential, Standardredoxpotential bei pH 7
 E_o 'scheinbares Mittelpotential', Redoxpotential bei
 50% Reduktion

n' 'scheinbarer Elektronenübergangskoeffizient'.

Man erhält ihn bei Anwendung der NERNST-Gleichung
 auf ein Fließgleichgewicht analog dem thermo-

dynamischen Gleichgewicht. $n' = \frac{59 \text{ mV}}{(\text{mV}/\Delta \log \text{ox/red} = 1)}$

2.2 Materialien

Sämtliche Chemikalien und Enzyme wurden in den höchsten
 erhältlichen Reinheitsgraden bezogen. Von BOEHRINGER
 (Mannheim): Lactat, Pyruvat, Malat, Oxalessigsäure, NAD
 (freie Säure), NADH (Dinatriumsalz), NADPH (Tetranatrium-
 salz), TRIS, TRAP, Glucoseoxidase (aus Schimmelpilzen),
 Katalase (aus Rinderleber), Trypsin (aus Rinderpankreas),
 Cyt.c (aus Pferdeherz), Malatdehydrogenase (aus Schweine-
 herz). Von MERCK (Darmstadt): Wasserstoffperoxid 30%,
 β -D-Glucose, Trikaliumhexaferat III, Menadion DRB 7 (Vi-
 tamin K_3 , löslich), Mercaptoäthanol, Dithioerythrit,
 Ammoniumsulfat, Titriplex III (Äthylendiamintetraacetat,
 Dinatriumsalz), Natriumcholat, Natriumdesoxycholat,
 TRITON X 100. Von PHARMACIA (Upsala) Sephadex DEAE, CM,
 G 50, G 75, G 100, G 200. Freundlicherweise zur Verfügung
 gestellt wurde: von M. SCHEULEN (Tübingen): angereicherte
 NADPH-Cyt.c-Reduktase (1.52 U Cyt.c/mg Prot., keine b_5 -Re-
 duktase-Aktivität, kein Cyt. b_5 und Cyt. P_{450}) und dl-Iso-
 proterenol-Hydrochlorid 98% (Aldrich Chem. Comp. Inc.,
 Milwaukee), von H. SIEB (München): Cumolhydroperoxid;

t-Butylperoxid (Peroxid-Chemie, München GmbH). Reinheit etwa 90%, der Rest bestand aus dem entsprechenden Alkohol. Lösungen wurden täglich frisch bereitet, von WOLLENBERG (Tübingen): 2-Hydroxy-Östradiol-17 β .

Die täglich frisch bereiteten Lösungen von Oxallessigsäure und NAD wurden mit NaOH neutralisiert.

Die Stammlösung der Enzymsubstrate wurde enzymatisch geprüft.

Puffer: Glycinpuffer (0.4 g Glycin + 0.2 ml Hydrazin - beides von MERCK - auf 10 ml H₂O). TRIS-, TRAP- und Citrat-Puffer wurden mit NaOH, HCl oder Maleinsäure auf den jeweiligen pH eingestellt. Sucrose-Puffer zur Mikrosomenisolierung: Sucrose 428 g/5 l, TRAP 9.38 g/5 l, EDTA 3.72 g/5 l, auf pH 7.2 eingestellt.

Biuretreagens: 2.25 g K-Na-Tartrat, 0.75 g CuSO₄·5H₂O, 1.25 g KJ, 0.2 N NaOH ad 250 ml (Chemikalien von MERCK Darmstadt).

2.3 Teste

2.3.1 Säure-Stop.

Zur Messung der Substratkonzentration in den Titrationsexperimenten wird die Enzymreaktion gestoppt, indem man 1 ml der Probe mit 0.2 ml einer 2 M HClO_4 -Lösung versetzt und 15 Minuten stehen lässt. Hiervon werden 1 ml zu 0.15 ml einer K_2CO_3 -TRAP-Lösung (je 1.6 ml) gegeben und nach Beenden der Reaktion geschüttelt und abzentrifugiert.

2.3.2 NADH-Messung

NADH wird gemessen im Eppendorf-Photometer bei 366 nm mit Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 3.4 \cdot 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ bei 365.5 nm (J. ZIEGENHORN, M. SENN und TH. BÜCHER 1976) oder im Rapid-Spektrophotometer im Wellendifferenzverfahren bei 340 - 395 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 6.1 \cdot 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$.

2.3.3 Pyruvat-Test, Oxalacetat-Test

0.5 ml Puffer TRAP/HCl 0.1 M, pH 7.5
5 μl LDH (5 mg/ml) bzw. MDH (5 mg/ml)
20 μl NADH (10 mg/ml = 13 mM) Endkonzentration 0.5 mM

2.3.4 Malat-Test, Lactat-Test

0.5 ml Glycinpuffer
20 μl NAD (150 mM) Endkonzentration 6 mM
5 μl LDH (bzw. MDH), (je 5 mg/ml)
Schichtdicke 1 cm, Temperatur 25° C. Gemessen wird in diesen Substratessen der Verbrauch bzw. die Entstehung von NADH.

2.3.5 LDH-Test

0.5 ml TRAP-Puffer, 0.1 M, pH 7.5, $t = 25^\circ \text{C}$
10 μl Na-Pyruvat (22 mg/ml = 0.25 M), Endkonz. 5 mM
10 μl NADH (10 mg/ml = 13 mM), Endkonz. 0.25 mM
Die Enzymeinheiten sind angegeben in Units ($\mu\text{Mol NADH/min}$).

2.3.6 Cytochrom- b_5 -Reduktase-Test

Die Aktivität der Reduktase wird angegeben in
Units: $\mu\text{Mol Akzeptor (FeCy, Cyt. c oder Cyt. } b_5) / \text{min}$

Test als NADH-FeCy-Reduktase

0.5 ml TRAP 0.1 M, pH 7.5

10 $\mu\text{l K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (16.5 mg/ml = 50 mM) Endkonz. 0.95 mM,

10 $\mu\text{l NADH}$ (10 mg/ml = 13 mM) Endkonz. 0.25 mM.

Gemessen wird die Reduktion des FeCy bei 405 nm,
Extinktionskoeffizient $\epsilon = 0.6 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$

(K. A. SCHELLENBERG und L. HELLERMANN, 1958).

Die Bestimmung der Reduktase-Aktivität in Mikro-
somen wurde durchgeführt unter Erhöhung der NADH-
Konzentration auf 2 mM Endkonzentration.

Test als NADH-Cyt- b_5 -Reduktase

0.5 ml TRAP 0.1 M, pH 7.5,

10 $\mu\text{l NADH}$ (10 mg/ml = 13 mM) Endkonz. 0.25 mM

5 nMol Cyt. b_5 , Endkonz. 10^{-5} M .

Cyt. b_5 wird gemessen wie unter Cyt. b_5 -Test.
beschrieben.

Test als NADH-Cyt.-c-Reduktase

0.5 ml TRAP 0.1 M, pH 7.5,

10 $\mu\text{l NADH}$ (10 mg/ml = 13 mM) Endkonz. 0.25 mM,

0.2 nMol Cyt. b_5 , Endkonzentration $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$,

10 nMol Cyt. c, Endkonzentration $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Cyt. c wird gemessen bei 550 nm mit einem Extink-
tionskoeffizienten von $\epsilon = 21.1 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$

(B.F. VAN GELDER, E.C. SLATER 1962)

2.3.7 Flavin-Messung

Die Konzentration des oxidierten Flavins der
Reduktase wurde photometrisch bestimmt bei 461 nm
mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 10.2 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$,
(E. PANFILI, G.L. SOTTOCASA, B. DE BERNARD 1971)

Zur Messung des Redox-Überganges des Flavins wurde die Extinktionsdifferenz $\Delta(\text{ox minus red})$ benutzt, bei:

$$461 \text{ nm} \quad \epsilon = 7.4 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$$

$$485 \text{ nm} \quad \epsilon = 6.9 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$$

(E. PANFILI et al. 1971).

Die gleichen Extinktionskoeffizienten gelten bei der Messung im Wellenlängendifferenzverfahren $\Delta 461 - 520 \text{ nm}$, $\Delta 485 - 520 \text{ nm}$.

2.3.8

Cyt. b_5 -Test

Zur Messung des Redox-Übergangs von Cyt. b_5 wurde die Extinktionsdifferenz reduziertes minus oxidiertes Cyt. b_5 an folgenden Wellenlängenpaaren benutzt:

$$\epsilon(424 - 409 \text{ nm}) = 185 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}, (\text{T. OMURA, R. SATO 1964})$$

$$\epsilon(424 - 436 \text{ nm}) = 116.5 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}, (\text{errechnet aus dem Cyt. } b_5\text{-Spektrum und dem Wert 185 für } \Delta E \text{ von } 424 - 409 \text{ nm})$$

$$\epsilon(550 - 575 \text{ nm}) = 21 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}, (\text{M. KLINGENBERG 1958})$$

Direkte Messung der Extinktion bei 424 nm mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 100 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)},$
(P. STRITTMATTER, S.F. VELICK, 1956)

2.3.9

Bestimmung von Cyt. P_{450}

Cyt. P_{450} wird bestimmt nach der Methode von T. OMURA und R. SATO, 1964, indem die Mikrosomensuspension in Mess- und Referenzküvette mit Dithionit reduziert und anschliessend die Messküvette mit CO ca. 1 Minute begast wird; gemessen wird die Extinktionsdifferenz $\Delta E (450 - 490 \text{ nm})$ mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 9.1 \cdot 10^4 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}.$

2.4

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Lösung wird mit der von G. BEISENHERZ et al. 1953 modifizierten Biuret-Methode bestimmt. 100 µl der Proteinelösung werden mit 0.2 ml 10%iger Trichloressigsäure versetzt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert und in 0.5 ml Biuret-Reagens gelöst. Nach 30 Min. Schütteln wird 0.5 ml Wasser zugegeben und bei 556 nm photometriert. Von dieser Extinktion subtrahiert man die nach Entfärben mit KCN verbliebene Extinktion, um die Trübung der Lösung zu eliminieren, sowie den Blindwert. Als Faktor wird 37 genommen. Der Proteingehalt errechnet sich: mg Protein/ml =

$$[(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probe} + \text{KCN}}) - (E_{\text{Blindpr.}} - E_{\text{Blindpr.} + \text{KCN}})] \cdot 37$$

2.5

Chromatographie-Methoden

Molekularsieb-Chromatographie mit Sephadex G 75, G 50 und G 200. Das Gel wird 2 Tage bei 0° C in 3 Liter Puffer vorgequollen, mit Hilfe einer Füllglocke in die Glassäule über Nacht einsedimentiert und dann zur Erreichung homogener Dichte 24 St. bei 0° C mit dem Puffer perfundiert (max. 50 ml/h). Ionenaustauscher-Chromatographie mit CM- und DEAE-Sephadex. Das Gel (20 - 30 g) wird 2 Tage in 3 l Wasser gequollen, abgenutscht und in 1 l 0.3 M Puffer mit jeweiligem pH eingestellt. Die Suspension wird erneut abgenutscht, mit 3 l Bidest gewaschen und in 5 l des Puffers mit niedriger Ionenstärke äquilibriert. Das so vorbereitete Gel wird in die Säule gefüllt und vorperfundiert. Zur Eluierung mit steigendem Konzentrationsgradienten werden zwei Pufferlösungen mit gleichem Volumen, zusammen etwa das Doppelte des

Säulenvolumens mit den gewählten minimalen (ohne NaCl) und maximalen Konzentrationen (meist 0.3 M NaCl) hergestellt. Die Gefäße gleicher Abmessung sind nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren miteinander verbunden, der Puffer niederer Konzentration wird luftdicht an die Säule angeschlossen. Da mit steigender Ionenstärke das Gel schrumpft, wird von Zeit zu Zeit die Pufferzufuhr unterbrochen, bis der sinkende Pufferspiegel die Gel-Oberfläche wieder erreicht. Dadurch werden Störungen des Konzentrationsgradienten im überstehenden Puffervolumen vermieden.

2.6 SDS-Gel-Elektrophorese

20 µg Protein werden in 10 µl 0.1 M TRIS, pH 8.0, 0.5 % SDS (Na-Dodecyl-Sulfat) gelöst und auf das Polyacrylamid-Gel (15%) aufgetragen. Nach 5 St. Laufzeit bei 150 V wird die Platte angefärbt mit 0.2 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in Methanol/H₂O/Essigsäure (5:5:1).

Durch Mitwandern einer Eichmischung aus Rinderserum-Albumin (MG 67.000), Hühneralbumin (MG 45.000), Chymotrypsinogen (MG 25.000) und Cytochrom c (MG 12.400) lässt sich das Molekulargewicht der Proteineinheiten ungefähr bestimmen.

2.7 Präparationen

- 2.7.1 Präparation von Mikrosomen aus Rattenleber
- Die frisch exzidierten Lebern von Wistar-Ratten (200 - 250 g) werden sofort in eisgekühltem Sucrose-Puffer gewaschen und im BRAUN-Multimix 2 x 45 Sekunden bei mittlerer Geschwindigkeit unter Zusatz des doppelten Volumens an Puffer homogenisiert. Die erste

Zentrifugation bei 6.500 g, 20 Minuten, entfernt Zellbruchstücke, Mitochondrien, Zellkerne und schwere Lysosomen. Der Überstand wird 70 Min. bei 80.000 g zentrifugiert. Der zytosolische Überstand dient zur LDH-Präparation. Der Niederschlag, leichte Lysosomen und die Mikrosomen, wird in 50 mM TRAP, pH 7.5, 0.1 M KCl gepottert und nochmals zentrifugiert. Dies dient zur Entfernung von Hämoglobin-Verunreinigungen. Der Niederschlag wird suspendiert und gepottert. Die Proteinkonzentration beträgt 15 - 20 mg/ml.

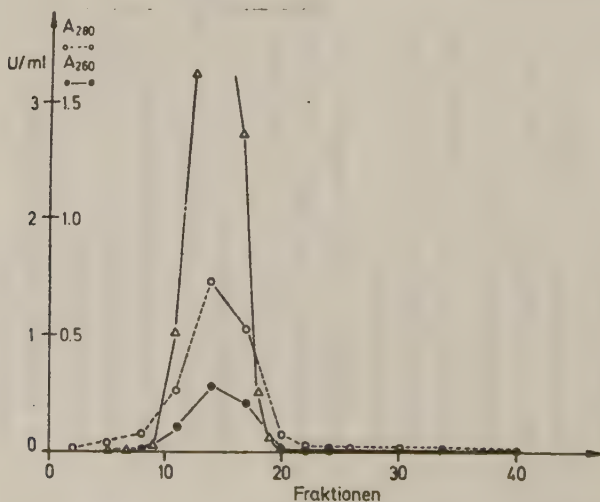
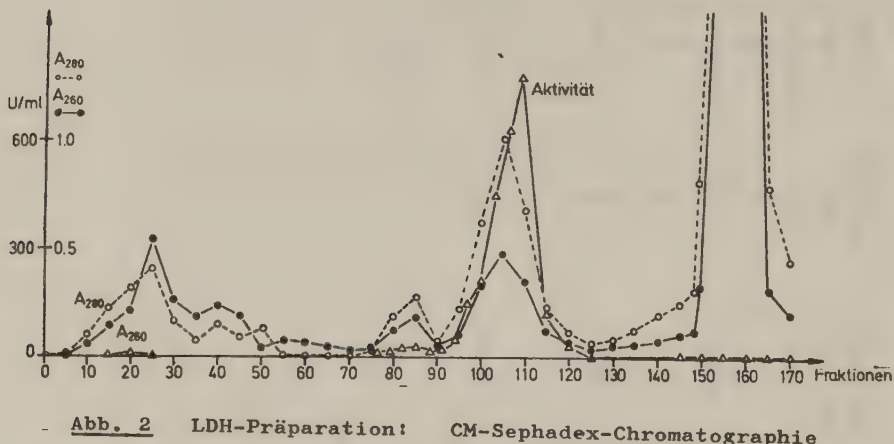
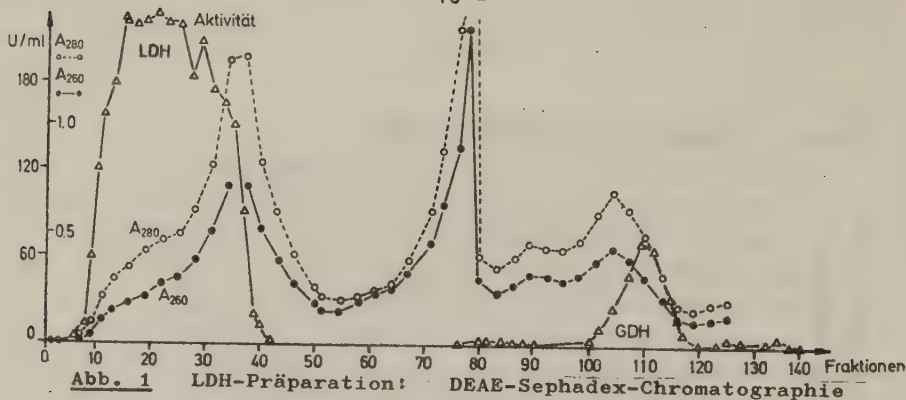
2.7.2

Isolierung von Lactatdehydrogenase

Lactatdehydrogenase von Typ 5 (M_4) wurde aus Rattenlebercytosol isoliert und kristallisiert.

Tab. 1 Schritte der LDH-Isolierung

Reinigungsschritt	Aktivität (U · 10 ³)	Ausbeute (%)	Protein (mg)	Spez. Aktivität (U/mg Prot.)
- Zytosol nach 2. Zentrifugation (70 Min. 80.000 g)	185	100	45.000	4.1
- Überstand nach 1. AS-Fällung (40% AS, 245 g/l = 1.5 M) und Zentrifugation (15 Min., 40.000 g)	150	81	20.000	7.5
- Niederschlag nach 2. AS-Fällung (60% AS, 390 g/l = 2.45 M) und Zentrifugation	130	72	7.200	18.6
- DEAE-Seph.-Chromatographie in 20 mM TRIS, 1 mM EDTA, 5 mM ME, pH 8.0 Konz. Gradient 0 - 300 mM NaCl	110	59	1.700	65
- Hitzedenaturierung (5 Min., 57°C, Proteinkonz. der Lösung 10 - 15 mg/ml)	93	50	310	300
- CM-Sephadex-Chromatographie in 10 mM Phosphat-Puffer, pH 6.2, Konz. Gradient 0 - 200 mM NaCl	61	33	110	550
- G 100-Seph.-Chromatographie in 0.1 M TRAP, pH 7.6	55	29	90	610



2.7.3

Isolierung von try-b₅ nach OMURA und TAKESUE 1970

Tabelle 2: Schritte der Isolierung des try-b₅

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Cyt. b ₅ (nMol)	nMol Cyt.b ₅ - mg Prot.	Ausbeute (%)
- Gewaschene Mikrosomen in 0.1 M TRIS, pH 7.2	9.800	4.000	0.5	100
- Nach Inkubation mit Trypsin (0.3 mg/ml, Protein 15 mg/ml 15 St., 0° C), Überstand nach Zentrifugation	770	2.700	4.8	67.5
- Pellet	9.000	-	-	-
- Sephadex-G 75-Chromatographie in 0.1 M TRIS, pH 7.5	52	1.800	34.5	45
- DEAE-Seph.-Chromatographie in 10 mM TRIS/HCl, pH 7.5, Konzentrationsgrad. 0 - 400 mM KCl	14.4	1.040	80	29
- Nach Gefriertrocknen	11.4	920	80	23

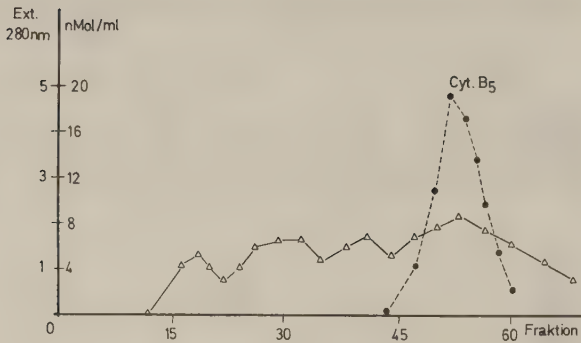


Abb. 4 try-b₅-Präparation: G 75-Sephadex-Chromatographie

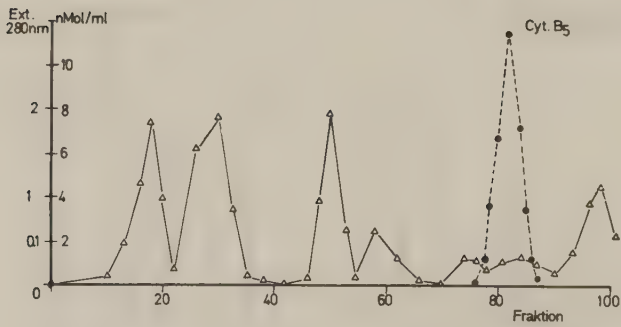


Abb. 5 try-b₅-Präparation: DEAE-Sephadex-Chromatographie

2.7.4 Isolierung von det-b₅ (Schritte 1 bis 4 nach ITO und SATO 1968)

Tab. 3 Schritte der det-b₅-Präparation

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Cyt. b ₅ (nMol)	Q _E	($\frac{\text{nMol b}_5}{\text{mg Prot.}}$)	Ausbeute (%)
- Gewaschene Mikrosomen, solubilisiert in 0.1 M TRIS HCl, pH 8.0, 0.6% TRITON X-100, 1 mg DOC/mg Protein, nach Zentrifugation	3.300	1.320	72	0.45	100
- AS-Fällung, Überstand nach 10% AS (56 g/l)	1.250	1.090	30	1.08	82.5
- 2. AS-Fällung, Niederschlag nach 25% AS (144 g/l), Lösen des Pellets in Puffer ohne Detergens	526	770	22	1.46	58.3
- G 75-Sephadex-Chromatographie, Säule 4 x 100 cm, 0.1 M TRIS/HCl, 0.7% TRITON, 0.3% DOC	80	615	4.2	7.7	46.6
- DEAE-Sephadex-Chromatographie, Säule 2 x 60 cm, 0.05 M TRIS/HCl, pH 7.6, 0.5% TRITON, Konzentrationsgradient	10.6	380	0.9	36	28.8
0 - 0.4 M KCl					
- G 50-Sephadex-Chromatographie, Säule 2 x 80, 0.1 M TRIS/HCl, pH 7.5, kein Det.	4.6	230	0.65	49	17.4
- Aceton-Fällung (Zugabe von 7-fachem Vol-90%igem Aceton, - 15°C), Zentrifugation nach 2 Min., 8.000 g 10 Min., nach Lösen in 0.1 M TRAP, pH 7.0, Zentrifug. 10 Min. 40.000 g.	4.3	230	0.61	53	17.4

$$Q_E = \frac{\Delta E(275 - 350 \text{ nm})}{\Delta E(424 - 450 \text{ nm})} \text{ (red - ox)}$$

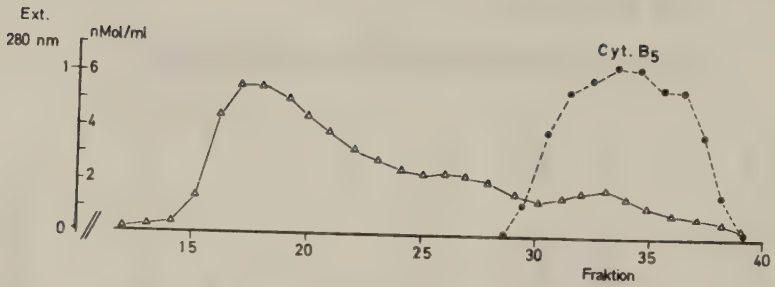


Abb. 6 det-b₅-Präparation: G 75-Sephadex-Chromatographie

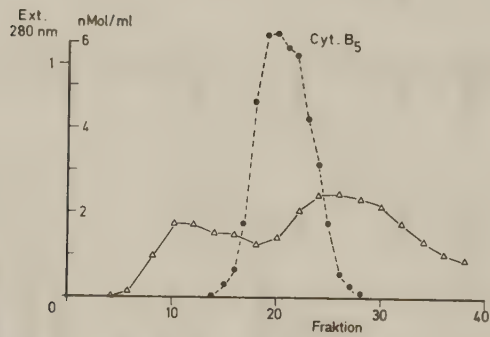


Abb. 7 det-b₅-Präparation: DEAE-Sephadex-Chromatographie

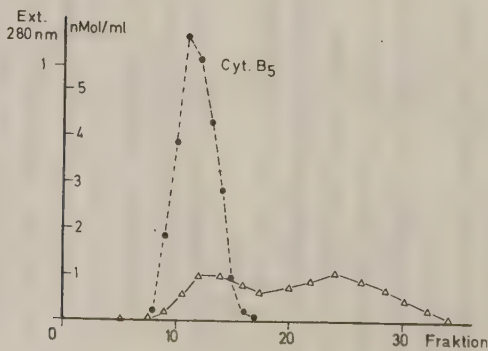


Abb. 8 det-b₅-Präparation: G 50-Sephadex-Chromatographie

2.7.5 Isolierung von lys-Reduktase (Schritte 1 - 6 nach TAKESUE und OMURA 1970)

Tab. 4 Schritte der lys-Reduktase-Präparation

Reinigungsschritt	Protein (mg)	NADH-FeCy- Reduktase-Aktivität (U gesamt)	Ausbeute Anrei- cherung (%)
- Gewaschene Mikrosomen, in 0.1 M TRIS, pH 7.5	12.820	29.500	100
- Solubilisation (5St.gerührt bei 35°C in 0.1 M TRIS/MALEAT, pH 5.7, 0.5 mM DTE)	12.800	28.320	96
- Überstand nach Zentrifugation (40.000 g 20 Min. 0°C, pH auf 7.8 mit NaOH einge- stellt)	546	27.150	92
- Überstand nach Zentrifugation der ersten AS-Fällung 45 % AS (277 g/l)	203	20.940	76
- Pellet nach Zentrifugation der 2. AS-Fällung 80% AS, (561 g/l)	140	18.500	62.5
- G-75-Sephadex-Chromatographie, Säule 4 x 100 cm, 0.03 M TRIS/HCl, pH 8.0	67	17.100	58
- 1 mM EDTA, 0.5 mM DTE			
- DEAE-Sephadex-Chromatographie, Säule 2 x 40 cm, 0.03 M TRIS/HCl, pH 8.0	15.1	13.300	44
- 1 mM EDTA, 0.5 mM DTE, Konzentrations- gradient 0 - 0.3 KCL			
- Nach Dialyse gegen 200%ige Lösung von Polyäthylenglykol 20.000 in 0.1M TRIS, pH 7.6, 0.5 mM DTE	14.3	12.400	42
- G 75-Sephadex-Chromatographie, Säule 4 x 100 cm, 0.1 M TRIS, pH 7.0, 0.5mM DTE	5.4	11.000	37
		2.050	891

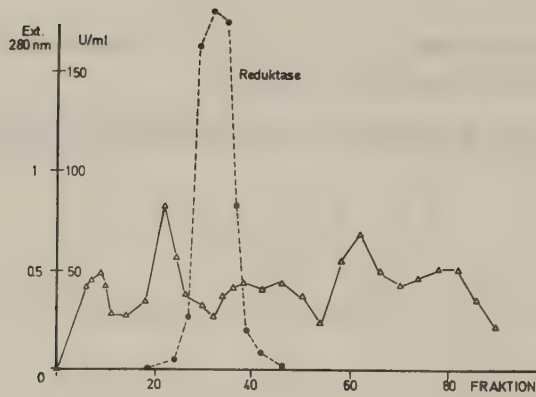


Abb. 9 1. G 75-Sephadex-Chromatographie

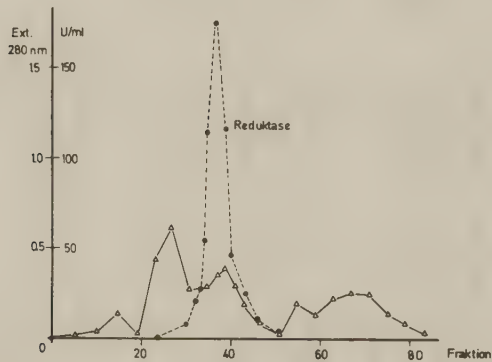


Abb. 10 DEAE-Sephadex-Chromatographie

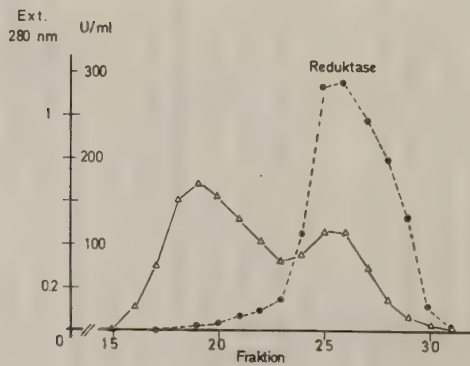


Abb. 11 2. G 75-Sephadex-Chromatographie

Tab. 5 Schritte der det-Reduktase-Präparation

Reinigungsschritt	Protein (mg)	NADH-FeCy-Reduktase- Aktivität (U _{gesamt})	Ausbeute (%)
- Gewaschene Mikrosomen, solubilisiert in 0.1 M TRIS/HCl, pH 8.0, 0.6% TRITON X-100, 1 mg DOC/mg Protein	11.400	28.500	100
- Überstand nach Zentrifugation der 1. AS- fällung, 10% AS (56 g/l)	6.350	28.000	99
- Niederschlag nach 2. AS-Fällung 25% AS (144 g/l), Pellet in 0.1 M TRIS/HCl pH 8.0 (ohne Detergens) gelöst	1.880	21.050	74
- G 75-Sephadex-Chromatographie in 0.1 M TRIS pH 8.0, 0.6% TRITON, 0.4% DOC, 0.5 mM DTE	450	16.720	58.7
- 2 Tage Dialyse gegen 0.05 M TRIS, pH 7.6 0.5% TRITON, 0.5 mM DTE, 1 mM EDTA	440	15.500	54
- G 50-Sephadex-Chromatographie in 25 mM TRIS/HCl, pH 7.6, 0.4% TRITON, 1 mM EDTA 0.5 mM DTE	112	10.530	37
- DEAE-Sephadex-Chromatographie, 0.025 M TRIS/HCl pH 7.6, 0.4% TRITON, 0.5 mM DTE, Konz.-Gradient 0 - 0.5 M KCl	32.5	5.130	18
- Dialyse gegen 5-faches Volumen, 0.1 M TRAP pH 7.6, 100%iges Polyäthylenglykol 20.000, 6 St.	22.3	3.360	11.8
- Acetonfällung: Zugabe von 10-fachem Vol. 90%igem Aceton (-15°C), nach 2 Min. ab- zentrifugiert (10 Min., 8.000 g), nach Lösen in 0.1 M TRAP/HCl, pH 7.5 (ohne Det.), neue Zentrifugation 10 Min., 40.000 g.	13.7	2.340	8.2
- Sephadex G-200-Chromatographie, Säule 1 x 100 cm in 0.1 M TRAP/HCl, pH 7.5, 0.5 mM DTE, 1 mM EDTA	8.6	1.850	6.5

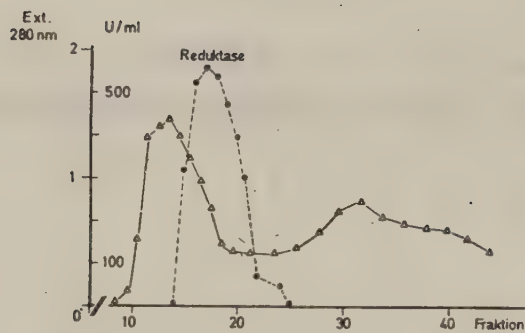


Abb. 12 G 75-Sephadex-Chromatographie

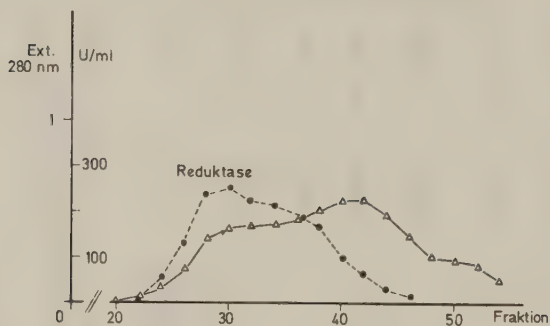


Abb. 13 DEAE-Sephadex-Chromatographie

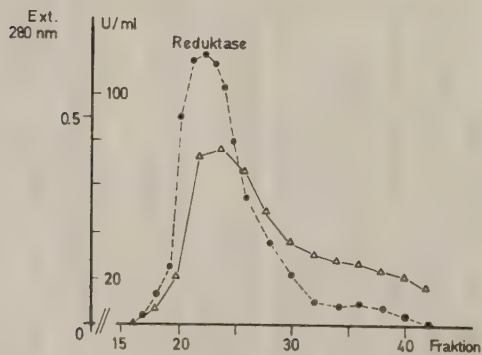


Abb. 14 G 200-Sephadex-Chromatographie

2.8

Potentiometrische Titrationsen mit der Platin-Elektrode

Redox-Titrationsen nach der Methode von DUTTON (1971) und DUTTON, WILSON und LEE (1970) wurden an der Apparatur von VON JAGOW (unpubl.) durchgeführt. Eine anaerobe Küvette mit einer Platinelektrode wurde im Double-Beam-Spektrophotometer nach CHANCE photometriert. Das durch Dithionit- und FeCy-Zugabe eingestellte Redoxpotential setzt sich über Redox-Mediatoren mit der Platinelektrode ins Gleichgewicht.

2.9

Sauerstoff-Messung

Der Sauerstoffgehalt der Messlösung wird polarographisch mit einer Platin-Mikroelektrode nach Clark gemessen.

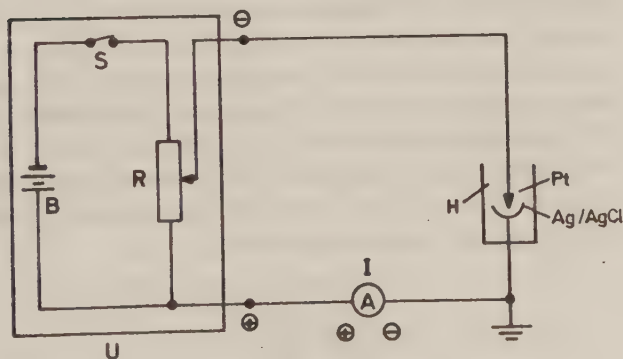


Abb. 15

Schematische Darstellung des polarographischen Messkreises.

U = Spannungsquelle für Polarisationsspannung,
 B = Batterie, S = Schalter, R = Potentiometer,
 A = Amperemeter, M = Polarographische Messzelle, Ag:AgCl = Silber-/Silberchlorid Elektrode
 Pt = Platinelektrode

Die Platinkathode hat einen Durchmesser von $20\text{ }\mu\text{m}$. Ihr Glasmantel ist von einem Silberrohr (Anode) umgeben, das als Bezugselektrode dient. Platin und Silber sind durch 0.1 n KCl-Lösung verbunden und durch eine $12\text{ }\mu\text{m}$ dicke Teflon-Membran vom Messmedium getrennt. Ag/AgCl hat als Elektrode 1. Art ein konstantes Potential.

Gemessen wird bei einer Polarisationsspannung von 0.75 V . Der Strom beträgt etwa 10 nA bei einem $p\text{O}_2$ von 1000 mbar , d.h. das Mess-System selbst verbraucht nur 1 pMol (10^{-12} Mol) O_2/Min . Das Rausch-äquivalent des Gerätes entspricht 10^{-13} A Eingangsstrom.

Für spektrophotometrische Untersuchungen bei gleichzeitiger Sauerstoffmessung steht eine Glasküvette von 1 ml Inhalt zur Verfügung, auf die ein Plexiglasaufsatz mit einem kleinen Rührer unter der O_2 -Elektrode angebracht wird. Sie ist luftdicht abgeschlossen. Durch eine kleine Einfüllöffnung (Durchmesser 0.5 mm , Länge 10 mm) kann Substrat mit einer Hamilton-Mikrospritze zugegeben werden. Die Sauerstoffdiffusion durch das Plexiglas und die Einfüllöffnung ist vernachlässigbar. Die Zeit nach Zugabe von Substrat bis zu homogener Vermischung der Lösung beträgt etwa 0.5 sec . und erlaubt kinetische Messungen im Sekundenbereich.

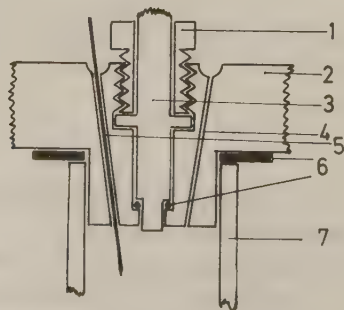


Abb. 16 Küvettenaufsatz für anaerobe Spektroskopische und polarographische Messungen

- Legende zu Abb. 16:
- 1 Arretierschraube
 - 2 Plexiglashalterung
 - 3 O₂-Elektrode
 - 4 Einfüllkanal
 - 5 Rührer-Welle
 - 6 Dichtungsgummi
 - 7 Küvette

Berechnung des O₂-Gehaltes der Messlösung

Als Grundlage für die O₂-Berechnung wird ein mittlerer Luftdruck in München (514 m ü. NN) von 960 mb angenommen. Die Temperatur der Messung beträgt 25° C. Bunschenscher Löslichkeitskoeffizient für O₂ (25° C): 0.02831 (D'ANS-LAX 1967).

O₂-Anteil der Luft 20.9%

Wasserdampf-Druck 32 mb.

Mol-Volumen O₂: 22.39 (l/Mol).

O₂-Konzentration der Lösung: $\frac{0.02831 \cdot 928 \cdot 0.209}{1013 \cdot 22.39} = 0.242 \text{ mM}$

Eichung der Sauerstoffelektrode

Luftgesättigter 0.1 M TRAP-Puffer, 1 mM FeCy, 25°C, wird titriert nach MISRA und FRIDOVICH (1976) mit kleinen Mengen frisch bereiteter Phenylhydrazin/Hydrochloridlösung. Der Sauerstoff-Verbrauch ist eine Funktion der Konzentration an zugesetztem Phenylhydrazin. Die Stöchiometrie beträgt 1 Atom O (1/2 O₂) pro Molekül Phenylhydrazin.

Wird die O₂-Elektrode nach dieser Methode geeicht, ergibt sich eine lineare Sauerstoffdruck-Elektrodenstrom-Abhängigkeit.

Im Anschluss an jede Sauerstoffmessung mit der Elektrode wird durch Zusatz von etwa 5 µl 1 M Dithionit-Lösung der Nullpunkt bestimmt und die Messwerte auf diesen Nullwert bezogen.

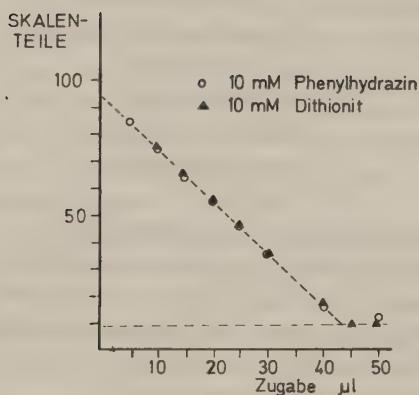


Abb. 17 Eichung der O_2 -Elektrode durch Zugabe von Phenylhydrazin- und Dithionit-Lösung zu luftgesättigtem Puffer (1 ml 0.1 M TRAP, pH 7.0, 1 mM FeCy, 25°C).

2.10

Geräte zur Spektralphotometrie

Cary-119-Spektralphotometer

Aerobe Spektren und Titrationsen wurden am Cary 119 durchgeführt. Der Messbereich ist auf maximal 20 mE pro Skalenbreite zu spreizen. Das apparative Rauschen liegt bei 0.5 - 1 mE. Die langsamen Kinetiken der Titration liessen sich aufzeichnen im Zweiwellenlängenverfahren. Dabei wird bei konstantem Zeitvorschub des Schreibers der Monochromator von Hand zwischen den beiden Wellenlängen verstellt. Im Referenzstrahl befand sich bei Flavin-Titrationsen Luft, bei Cyt. b_5 -Titrationsen und Mikrosomen-Titrationsen eine Küvette mit gleichen Konzentrationen, die während der Titrationsen mit Puffer verdünnt wurde.

Rapidspektroskop 'München' T 13/21, Deutsche Howaldswerke AG, Kiel

Das Rapidspektroskop wurde für aerobe und anaerobe Titrationsen benutzt. Es erlaubt:

1. die Registrierung von 40 Spektren/sec mit einer

- veränderbaren Bandbreite zwischen 0 - 100 nm,
2. aufgrund hier entwickelter Verfahren (Teilprojekt D12 (BRAUSER) des SFB 51 der DFG) die kontinuierliche Zweiwellenlängendifferenz-Messung
 3. die Registrierung von Differenzspektren aus nacheinander aufgenommenen Summationsspektren mittels Rechneranschluss (FABRI-TEK, Kleincomputer-Modell 1072, als Mittelwertrechner und Speicher) (BRAUSER 1968)

Bei dieser photometrischen Anordnung ist das Rauschen kleiner als 0.05 mE.

Das Photometer wurde mit einem Neodym-Filter geeicht. Die Absorptionsdifferenz zwischen dem Peak 428.58 nm und dem Minimum 558 nm ist 188 mE.

2.11 Standard-Redox-Potentiale

2.11.1 Standard-Redox-Potential von NAD/NADH

Nach der Gleichung



ist das Mittelpotential

$$E'_0 = 29.5 \log \frac{\text{NAD}}{\text{NADH}} - 29.5 \cdot \text{pH}$$

Bei 30° C ist das Mittelpotential nach RODKEY (1955) potentiometrisch durch Redox-Titrationen bestimmt

$$E'_0 = -107.1 - 30.1 \cdot \text{pH} \quad (\text{mV})$$

also - 318 mV (pH 7.0).

Mit einem Temperaturkoeffizienten $\Delta E'_0 / \Delta T = -1 \text{ mV}/^\circ\text{C}$ ist das Mittelpotential bei 25° C

$$E'_0 = -313 \text{ (mV)}.$$

BURTON und WILSON (1953) bestimmten das Mittelpotential aus Gleichgewichtsmessungen bei 25° C auf

$$E'_0 = -320 \pm 4 \text{ (mV)}.$$

Den Berechnungen wurde ein Mittelpotential von - 313 mV (25° C, pH 7.0) zugrunde gelegt.

2.11.2 Standard-Redoxpotential von Lactat/Pyruvat
Die Gleichgewichtskonstante der LDH-Reaktion

$$K_{eq} = \frac{[Pyr] \cdot [NADH] \cdot [H]}{[Lac] \cdot [NAD]}$$

wurde von HAKALA, SCHWERT et al. (1956) angegeben mit

$$(1) \quad K_{eq} = 2.76 \cdot 10^{-12} \text{ (M)} \quad T = 25^{\circ}\text{C}$$

oder

$$K' = K/[H^+] = 2.76 \cdot 10^{-5} \text{ bei pH} = 7.0 \text{ C.}$$

KREBS und VEECH (1970), LUND, WILLIAMSON und KREBS (1967) bestimmten sie zu:

$$(2) \quad K_{eq} = 11 \cdot 10^{-12} \text{ (M)} \quad \text{pH} = 7.2, T = 38^{\circ}\text{C},$$

$$\mu = 0.25.$$

Das Mittelpotential des Lactat/Pyruvat-Paares ist nach der Gleichung



und mit der Nernst-Gleichung

$$E_{O L/P} = 29.5 \log \frac{[Pyr] \cdot [H^+]^2}{[Lac]} \quad (\text{mV})$$

$$= 29.5 \log \frac{P}{L} - 59 \text{ pH} \quad (\text{mV})$$

$$\text{Mit } \Delta E'_O = 2.3 \cdot \frac{RT}{n \cdot F} \cdot \log K' \quad (\text{pH } 7.0)$$

ergibt sich für die Differenz zwischen Lactat/Pyruvat- und NADH/NAD-Redoxpotential

$$\Delta E'_O = E'_{O I/P} - E'_{O NADH}$$

$$\Delta E'_O = - 132.4 \text{ mV}$$

Das Lactat/Pyruvat-Mittelpotential ist also (25°C , pH 7.0)

$$E'_{O L/P} = - 180.7 \text{ mV mit } (1) \quad (25^{\circ}\text{C})$$

Für die Berechnungen wurde ein Potential von - 180 mV zugrunde gelegt.

2.11.3 Standard-Redox-Potential von Malat/Oxalacetat.
Das Gleichgewicht des Malat/Oxalacetat-Paares wurde von RAVAL und WOLFE (1962) bestimmt mit

$$(1) K_{eq} = 1.02 \cdot 10^{-12} \quad (25^{\circ} \text{ C, pH 7.0),}$$

von STERN, OCHOA und LYNEN (1952) mit

$$(2) K_{eq} = 2.33 \cdot 10^{-12} \quad (23^{\circ} \text{ C, pH 7.2)}$$

Mit dem NADH/NAD-Potential von - 313 mV ergibt sich ein Redoxpotential

$$E'_{O \text{ M/O}} = - 165.7 \text{ mV mit (1)}$$

$$E'_{O \text{ M/O}} = - 176 \text{ mV mit (2)}$$

MAHLER und CORDES (1968) geben - 170 mV an.

Dieser Wert wurde auch den Berechnungen zugrunde gelegt.

2.12 Anaerobe Titration durch Eliminierung des Luft-Sauerstoffes mit Glucoseoxidase

Anaerobe Messungen wurden in einer verschliessbaren Küvette mit einem Plexiglasaufsatz durchgeführt, der mit einer O_2 -Elektrode und einem Mikrorührer bestückt war. Die Eliminierung des Luftsauerstoffs durch Evakuieren der Küvette und Begasen mit gereinigtem Stickstoff hat die Nachteile, dass der Luftsauerstoff nur schwer quantitativ zu entfernen ist. Ausserdem wird bei der Titration mit jeder Zugabe geringe Mengen an Luft zugesetzt. Diese Nachteile werden vermieden durch Zugabe von Glucoseoxidase zu allen benutzten Lösungen, pro ml Lösung:

0.02 mg Glucoseoxidase (5 μ l einer Lösung von
4 mg/ml)

1 μ l konzentrierte Katalaselösung

10 μ l frisch bereitete Glucoselösung (2 M)

Ältere Glucoselösungen entwickeln Oxidationsäquivalente. Sie können reduziertes Flavin und Cyt.b₅ direkt oxidieren.

Nach 20 bis 25 Minuten Inkubation ist die Lösung vollständig anaerob. Die bei der Titration benutzten Substratlösungen sind durch GOD ebenfalls anaerob. Bei ihrer Zugabe werden geringe O₂-Mengen mit eingebracht, die aber in 1 - 3 Minuten reduziert sind. Ist die Umsetzung des Sauerstoffs noch nicht vollständig, so sind die Spektren der Katalase-Compound I (Katalase-H₂O₂, bei 405 nm) und des GOD-Semichinons (500 - 550 nm) messbar. Diese überlappen das Cyt.b₅-Spektrum (460 - 530 nm). Sie haben jedoch eine bedeutend geringere Extinktion und verschwinden ausserdem, sobald der Luftsauerstoff verbraucht ist. Die Absolutspektren von GOD und Katalase spielen bei der Zwei-Wellenlängen-Differenzmessung keine Rolle. GOD und Katalase selbst haben keinen Einfluss auf die anaeroben Redox titrationen. Ersetzt man sie durch 0.1 mg Mitochondrien/ml (+ 5 mM Succinat), so ist nach vollständiger Reduktion des Luftsauerstoffs die Redox titration gleich der mit GOD.

2.13

Durchführung der Redox titration

Die Redox titration mit Lactat/Pyruvat und Malat/Oxalacetat wurden in TRAP-Puffer, nicht in TRIS durchgeführt, da wegen der Additionsverbindung von Ketosäuren mit dem Trishydroxymethylmethan (MAHLER 1961) die Redox-Potentiale verändert werden können.

2.13.1

Das Prinzip der Redox-Titration

Das Prinzip der Redox-Titration ist die Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei Redoxpaaren, wobei die Konzentration des einen Paares (Lactat/Pyruvat, Malat/Oxalacetat) gross ist gegen die des anderen

Paares. Bei Gleichgewichtseinstellung tritt kein wesentlicher Fluss an Reduktionsäquivalenten ein, dieses Redoxpaar in hoher Konzentration wirkt als Redoxpuffer. Ein eingestelltes Substanzverhältnis ox/red des Puffers bewirkt ein konstantes Redoxpotential, das sich über die nachfolgenden Glieder der Redoxkette fortsetzt. Ist das thermodynamische Gleichgewicht erreicht, dann ist das vorhandene Redoxpotential:

$$E = E_{o1} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{Ox_1}{Red_1} = E_{o2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{Ox_2}{Red_2}$$

Dies ist die Gleichung einer Geraden E als Funktion von $\log \frac{ox}{red}$, wobei die Steigung der Geraden proportional $1/n$ ist.

Trägt man den Reduktionsgrad $\frac{[red]}{[ox] + [red]}$ gegen E auf, so erhält man eine typische Titrationskurve, die symmetrisch S-förmig ist und asymptotisch zu 0 und 100% red hinläuft. Der Wendepunkt dieser Titrationskurve entspricht dem Mittelpotential. Das Mittelpotential der Substanz ist das Potential, an dem gemäss der Nernst-Gleichung 50% der Substanz reduziert vorliegt ($\log \frac{ox}{red} = 0$). Bei einem steady-state wird das Potential bei $\log \frac{ox}{red} = 0$ 'scheinbares Mittelpotential' E_a genannt, im Gegensatz zum 'wahren Mittelpotential' E_o des thermodynamischen Gleichgewichts.

Der Stöchiometriefaktor n des Elektronenüberganges der Nernst-Gleichung lässt sich ermitteln aus der Potentialdifferenz bei $\Delta \log \frac{ox}{red} = 1$. Er beträgt $n = 1$ bei 59 mV Potentialdifferenz zwischen Reduktionsgrad 50% und 91 % red.

2.13.2 Reversibilität

Die Redoxreaktionen sind nur dann im Gleichgewicht (thermodynamisches oder Fließ-Gleichgewicht), wenn die Redox-Titration reversibel ist. Die Titrationskurve bei schrittweiser Oxidation muss im selben experimentellen Ansatz gleich der bei schrittweiser

Reduktion sein. Bei der Rücktitration erhöht sich die Substratkonzentration in der Messlösung sehr. Durch diese Veränderung der Ionenstärke ist das durch $\log L/P$ gesetzte Redoxpotential nicht beeinflusst, da sich der Aktivitätskoeffizient aus dem Quotienten herauskürzt. Für eine messbare Veränderung des Standard-Redox-Potentials mit der veränderten Ionenstärke ergab sich bei den Titrationen kein Anhaltspunkt.

Die durch die Substrat-Zugabe bewirkte Verdünnung während der Titration wird bei der Messung der Extinktion mit einberechnet. Die verschliessbare Küvette fängt das durch den Substrat-Einfüll-Tunnel ausfliessende Volumen in einem kleinen Becken auf. Dieses ausgeflossene Volumen wird also nicht weiter mitverdünnt. Diese Abweichung von einer linearen Verdünnung kann aber in der Berechnung vernachlässigt werden.

2.13.3 Kontrolle der Reduktionsgrade 0 % und 100 %

Die titrierten Substanzen NAD, Reduktase und Cyt. b_5 liegen in der oxidierten Form vor. Der Ausgangspunkt der Titration ist entweder dieser Reduktionsgrad 0% oder nach Reduktion mit Lactat (Malat) der Reduktionsgrad 100%. Nach Beenden der Reduktase- und Cyt. b_5 -Titrationen werden die den Reduktionsgraden 0 und 100% entsprechenden Extinktionen kontrolliert durch Zugabe von 20 mM NADH und danach 5 mM FeCy. Die Geschwindigkeit der Reduktion bzw. Oxidation des Flavins und des Cytochroms durch diese Substrate in diesen Konzentrationen ist so schnell, dass die Gleichgewichtseinstellung mit dem Redox-Puffer in den ersten Minuten zu vernachlässigen ist.

2.13.4 Kontrolle der Substratspiegel

Substratspiegel wurden nach Beenden der Titration

durch Säurestop der enzymatischen Reaktion kontrolliert. Bei allen Messungen war die eingesetzte rechnerische Substratmenge gleich der mit der Kontrolle ermittelten innerhalb des Bestimmungsfehlers von $\pm 1\%$ (Pyruvat) bzw. $\pm 2.5\%$ (Lactat). Der Verlust reduzierender Äquivalente durch Autoxidation ist also innerhalb des Fehlers der Substratbestimmung und hat keinen messbaren Einfluss auf das eingestellte Redoxpotential.

2.14

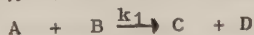
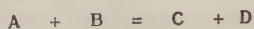
Computerprogramm zur Simulierung des Enzym-Systems

Das von GARFINKEL (1962) entwickelte Programm wurde von SCHWAB auf den TR 440-Rechner des Leibnitz-Rechenzentrums der Bayrischen Akademie der Wissenschaften adaptiert. Das Programm erlaubt die Bestimmung der Eigenschaften eines komplexen Systems (Modells) als Funktion der Zeit. Das Modell ist konventionell definiert durch chemische Reaktionen und zugeordneten numerischen Daten. Die Basis der Sprache ist die Reaktion



Die physikalischen Gesetze implizieren:

- a) die Rückreaktion (Ausnahme, irreversible Reaktionen möglich)
- b) der Fluss ist Geschwindigkeitskonstante mal Konzentration der linken (operativen) Seite. Für die Rückreaktion ist die rechte Seite die operative.
- c) Die Summe der Flüsse der Reaktionen einer Substanz mit entsprechendem Vorzeichen wird ihre Ableitung nach der Zeit.



$$\text{Fluss 1} = k_1 (A) (B)$$

$$\text{Fluss 2} = k_2 (C) (D)$$

$$\frac{d(A)}{dt} = \text{Fluss 2} - \text{Fluss 1}$$

Das Programm besteht aus einem Generator-Programm, das die chemischen Gleichungen in die entsprechenden Differentialgleichungen in FORTRAN schreibt und einem Simulatorprogramm, das diese Differentialgleichung löst. Die Resultate werden als Graph Konzentration gegen die Zeit ausgedruckt in einem Raster von 100 mal 100 Werten. Die Lösungsmethode des Systems der Differentialgleichungen ist im wesentlichen eine modifizierte Prediktor-Korrektor-Methode wie von GEAR (1971) beschrieben. Die Rechengenauigkeit ist 1 %.

Eine Besonderheit des GARFINKEL-Programms ist die Möglichkeit, für komplexere Enzymreaktionen die Methode nach KING und ALTMAN (1956) anzuwenden. Durch diese Methode der algebraischen Lösung von steady-state-Gleichungen wird erhebliche Rechenzeit gespart.

3 EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Präparationen

3.1.1 Mikrosomen

Mikrosomen wurden in einer Ausbeute von 8 - 10 mg/g Leber-Frischgewicht präpariert. Die Verunreinigung mit Mitochondrien betrug etwa 5% nach Messungen des Cyt. a/a_3 bei 605 nm ($E = 16(\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$, Gehalt der Mitochondrien 0.3 nMol/mg. Die Präparation war mit Lysosomen und etwas Peroxysomen verunreinigt. Der Gehalt an Cytochrom b_5 betrug 0.5 nMol/mg (TAKESUE und OMURA 1970, 0.55 nMol/mg) und an NADH-Cyt. b_5 -Reduktase 2.3 U/mg. Das entspricht bei alleiniger FeCy-Reduktion durch NADH-Cyt. b_5 -Reduktase in den Mikrosomen einem Gehalt von 0.065 nMol/mg (WEBER, WEIS und STAUDINGER 1972: 0.045 nMol/mg). ESTABROOK und COHEN: 0.02 - 0.05 nMol/mg). Der Gehalt an Cyt. P_{450} wurde auf 0.4 nMol/mg Protein bestimmt.

3.1.2 Lactatdehydrogenase

Lactatdehydrogenase wurde in 29% Ausbeute des Gehaltes der im Leberhomogenat nach der ersten Zentrifugation gefunden wurde, präpariert und kristallisiert. Die spezifische Aktivität ist 610 U/mg, dieser Wert ist höher als der von WIELAND, PFLEIDERER und ORTANDERL (1959) angegeben mit 450 U/mg (es wurde allerdings keine Proteinbestimmungsmethode mitgeteilt). VESTLING und HSIEH (1969) geben 101 U/mg auf der Basis eines anderen optischen Testes an. Die Kristalle bestehen aus einem dichten Filz feiner Nadeln. In der SDS-Gel-Elektrophorese wandert das Enzym als einheitliche Bande. Das Molekulargewicht der LDH-Einheiten kann durch Zusatz einer Eichmischung auf 35.000 ± 4.000 geschätzt werden. Damit

ergibt sich als Zahl der binding sites 30 nMol b.s./mg Protein. CASTELLINO und BARKER (1966) bestimmten das Molekulargewicht des Tetramers mit 140.000, was einem Molekulargewicht der Untereinheiten von 35.000 entspricht. Das Spektrum der LDH zeigt einen Peak bei 280 nm und eine Schulter bei 290 nm, die Extinktion einer 1%igen Lösung $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ bei 280 nm beträgt 12.75, VESTLING gibt einen Wert von 12.58 an.

Die NADH-Bindungskapazität des Enzyms wurde mittels Gelfiltration nach PFLEIDERER und AURICCHIO (1964) bestimmt. Sie beträgt 3.5 - 3.7 Mol NADH/Mol Enzym. Dies bedeutet einen Nukleotidgehalt des Enzyms von 10%. Nach Dialysieren der LDH gegen Aktivkohle stieg die Kapazität der NADH-Bindung auf 3.9 - 4,0 Mol NADH/Mol Enzym.

Die LDH/NADH-Dissoziationskonstante wurde fluorimetrisch nach BOYER und THEORELL (1956) und VELICK (1958) bestimmt, ausserdem fluoreszenzpolarimetrisch nach LAURENCE (1951). Nach SCATCHARD (1949) trägt man graphisch den Quotienten der Konzentration LDH-NADH-Komplex/ $\text{NADH}_{\text{frei}}$ gegen die Konzentration $\text{NADH}_{\text{frei}}$ auf und ermittelt aus der Geraden durch die Messpunkte die Dissoziationskonstante.

NADH-Dissoziationskonstanten K_D der LDH, 25° C:

pH:	6.1	7.1	7.8	6.4
K_D :	0.37	0.40	0.43	0.45 (μM)

3.1.3

try-b₅

Trypsin-solubilisiertes Cyt.b₅ wurde in einer Ausbeute von 23% mit einer Reinheit von 80 nMol Protohäm in Cyt.b₅/mg Protein als dunkelrote Substanz isoliert. Die SDS-Gel-Elektrophorese zeigt eine einheitliche Proteinbande mit dem Molekulargewicht von 12.000 $\pm$ 500.

G 75-Sephadex-Molekularsieb-Chromatographie zeigt ebenfalls ein Molekulargewicht von etwa 12.500.

GARFINKEL (1957) gibt 18.500 an, STRITTMATTER und VELICK (1956) 17.000, STRITTMATTER (1967) 12.900, TAKESUE und OMURA (1970) 12.500.

Das Differenzspektrum (red - ox) zeigt einen Peak bei 424 nm und 556 nm mit einer Schulter bei 559 nm, wie auch von GARFINKEL (1957) und TAKESUE und OMURA (1970) berichtet.

Hämoglobin, Cyt. P_{450} , sowie die mitochondrialen Cytochrome sind nicht nachweisbar. 100% des Dithionit-reduzierbaren Cytochroms lassen sich anaerob auch mit NADH und Cyt. b_5 -Reduktase reduzieren. Das Cytochrom ist lyophilisiert oder in 0.1 M TRAP, pH 7.0 bei - 20° C 1 Jahr ohne Verlust aufzubewahren.

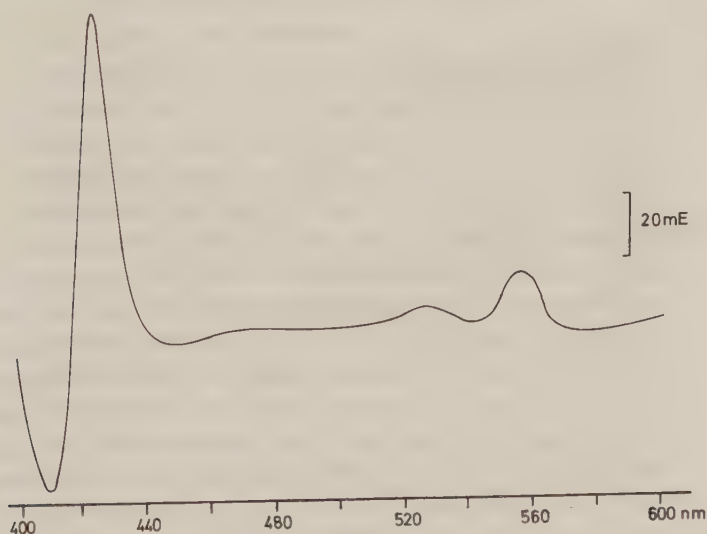


Abb. 18 Spektrum des try- b_5 . $\Delta E(\text{red} - \text{ox})$

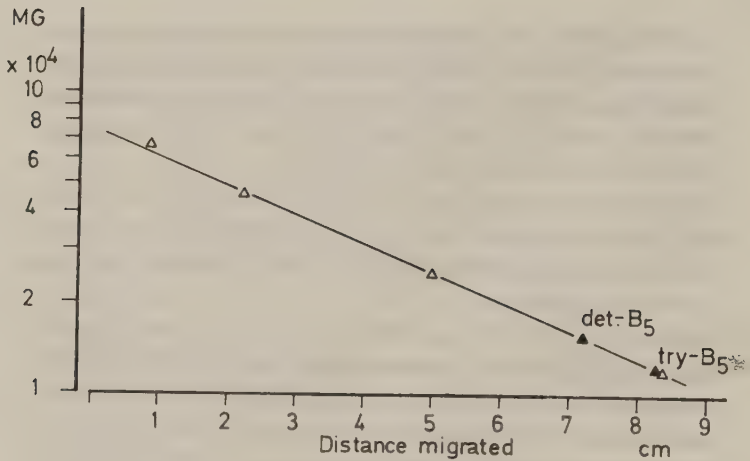


Abb.19 SDS-Gel-Elektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung von det-b₅ und try-b₅

3.1.4

det-b₅

Detergens-solubilisiertes Cyt. b₅ wurde in 17.4% Ausbeute mit einer Reinheit von 53 nMol Protohäm in Cyt.b₅/mg Protein isoliert. Die SDS-Gelelektrophorese zeigt eine einheitliche Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 15.500 und eine sehr schwache, färbbare Bande bei einem MG von 20.000. Mit einem Molekulargewicht von 15.500 errechnet sich ein Gehalt von 60 nMol/mg Protein, der von der Präparation nicht erreicht wird. Sie ist also zu etwa 10% mit Fremdprotein verunreinigt. Spektroskopisch unterscheidet sich det-b₅ nicht von try-b₅. NADH-Cyt.b₅-Reduktase-Aktivität war nicht nachweisbar, ebenso wenig Hämoglobin, Cyt.P₄₅₀ und mitochondriale Cytochrome. Das Molekulargewicht 15.500 stimmt gut überein mit dem von SPATZ und STRITTMATTER (1971) angegebenen MG von 16.100. ITO und SATO (1968) präparierten det-b₅ in 40 - 50-facher Reinigung mit einem MG von 25.000.

Die nach Aceton-Fällung durchgeführte Molekularsiebchromatographie auf G 75 Sephadex ohne Detergentien zeigten ein stark erhöhtes Molekulargewicht. Das Cyt.b₅ lief im Ausschlussvolumen der Säule. Diese Polymerisation des Cyt.b₅ in Abwesenheit von Detergentien berichteten auch STRITTMATTER, sowie ITO und SATO.

3.1.5

lys-Reduktase

Mit Lysosomen aus der Membran gelöster Reduktase (von STAUDINGER 'katalytisches Fragment' genannt) wurde in einer Ausbeute von 37% als zitronengelbe Lösung isoliert. Die Präparation ist nur bei schnellem Arbeiten und Zugabe von DTE zu allen Lösungen erfolgreich, da das Enzym labil ist. Beim Aufbewahren bei - 20° C verliert es in 3 Monaten etwa 30% der Aktivität.

Die spezifische Aktivität ist 2.050 U/mg bezogen auf FeCy-Umsatz. Das ist vergleichbar dem Wert 2.100 U/mg von TAKESUE und OMURA (1970). STRITTMATTER (1967) gibt einen auf NADH bezogenen turnover von 29.000 an. Dies ergibt bei einem Molekulargewicht von 28.000 1.650 U/mg. Die NADH-Cyt.c-Reduktase-Aktivität ist 95 U/mg, die NADH-Cyt.b₅-Reduktase-Aktivität ist 135 U/mg. Eine geringe NADPH-FeCy-Aktivität von 6 U/mg liess sich nachweisen, aber keine NADPH-Cyt.c-Aktivität in Abwesenheit von Cyt.b₅. Daher muss diese Reaktion mit NADPH der NADH-Cyt.b₅-Reduktase zugeschrieben werden, nicht einer Verunreinigung mit NADPH-Cyt.c-Reduktase. Ähnliches berichteten auch TAKESUE und OMURA (1970), nicht jedoch STRITTMATTER (1966 und 1967). Die SDS Gelelektrophorese zeigt eine einheitliche Proteinbande bei einem Molekulargewicht von

28.000. Die Molekularsiebchromatographie auf G 150 Sephadex mit den Eichsubstanzen LDH (MG 140.000), GDH (MG 78.000), PGK (MG 45.000) und Pferdemyoglobin (MG 17.800) bestätigt dieses Molekulargewicht. Das Spektrum des oxidiert vorliegenden Enzyms zeigt die Peaks bei 461 nm und 485 nm, die bei Reduktion des Flavins verschwinden, und die konstanten Peaks bei 275 nm und 392 nm. Das Verhältnis der Extinktionen 275 nm/461 nm ist 6.4 (TAKESUE UND OMURA (1970): 5.9, STRITTMATTER und VELICK (1957): 6.9). Spektroskopisch sind Hämoglobin und andere mikrosomale und mitochondriale Pigmente nicht nachweisbar.

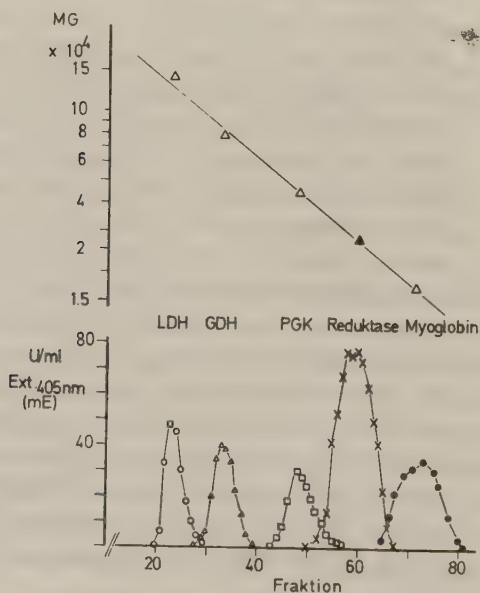


Abb. 20

Molekulargewichts-
bestimmung der
lys-Reduktase,
G 150-Sephadex-
Chromatographie

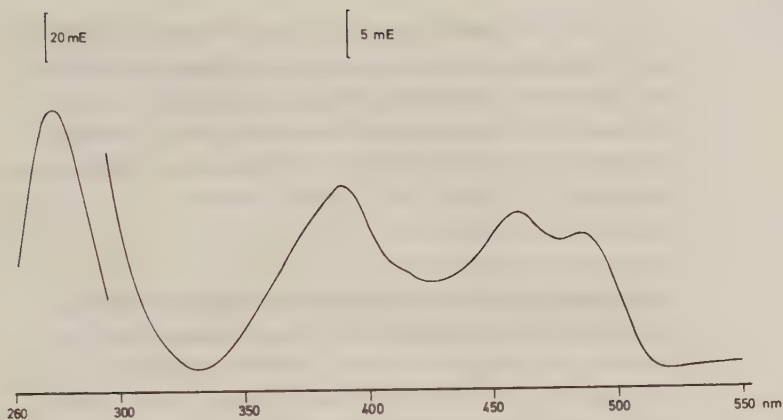


Abb. 21 Absolutspektrum der lys-Reduktase (oxidiert)

Der Flavingehalt errechnet sich aus der Extinktion der oxidierten Form bei 461 nm auf 30 nMol/mg. Bei Reduktion des Flavins mit Dithionit ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz bei 461 nm ebenso wie bei 485 nm 27 - 30 nm Flavin/mg, bei Reduktion mit 2 mM NADH 25 - 29 nMol/mg. Daraus lässt sich schliessen, dass bis zu 10% des Flavinenzyms nicht mehr NADH-reduzierbar ist.

3.1.6

det-Reduktase

Die mit Detergentien aus der Membran solubilisierte Reduktase ist labil und liess sich nur anreichern. Bei einer Ausbeute von 6.5% war die spezifische Aktivität (bezogen auf FeCy) 215 U/mg. Weitere Reinigungsversuche hatten höhere Verluste zur Folge ohne nennenswerte Erhöhung der spezifischen Aktivität.

Das Spektrum der det-Reduktase ist identisch mit der der lys-Reduktase. NADH-reduzierbares Flavin

beträgt 3 - 4 nMol/mg. Das Gesamtflavin (bei 461 nm) ist 4 nMol/mg. Es sind also ebenfalls etwa 10% des Flavins mit NADH nicht reduzierbar. Die NADH-Cyt.c-Reduktase-Aktivität beträgt 19 U/mg, die NADH-Cyt.b₅-Aktivität 11 U/mg. Die Präparation enthielt 0.02 nMol Cyt.b₅/nMol Flavin, aber keine anderen Cytochrome.

Die SDS-Gel-Elektrophorese zeigt eine starke Proteinbande bei einem Molekulargewicht von etwa 40.000, eine schwächere bei etwa 20.000 und 5 schwach anfärbbare weitere Banden zwischen 10.000 und 40.000. Die Reinheit der Präparation lässt sich sowohl anhand des Molekulargewichts von 43.000 (SPATZ und STRITTMATTER 1973) und des Flavingehaltes, wie auch anhand der spezifischen Aktivität im Vergleich zur lys-Reduktase schätzen. Sie beträgt etwa 15%, das entspricht der dreifachen Reinheit der Präparation von MIHARA und SATO (1972) (13% Ausbeute, 1.3 nMol Flavin/mg Protein, spezifische Aktivität 67 U FeCy/mg, 0.3 mg Phospholipide/mg Protein). PANFILI, SOTTOCASA und DE BERNARD (1971) präparierten eine Cyt.b₅-Reduktase mit 19% Ausbeute bei 208-facher Anreicherung der NADH-Cyt.c-Reduktase-Aktivität (70U/mg). Dieses Enzym zeigte sich in der SDS-Gel-Elektrophorese heterogen, enthielt Kohlenhydrate und bestand aus polymerisierten Untereinheiten des MG 19.000. SPATZ und STRITTMATTER (1973) geben keine Daten ihrer Präparation an.

In 0.5% TRITON X-100 lässt sich die Reduktase auf G 75 Sephadex chromatographieren mit einem Molekulargewicht von 40.000 $\pm$ 5.000. Die detergentienfreie Reduktase aber wandert in der Molekularsieb-

chromatographie auf G 200 Sephadex bei einem Molekulargewicht von über 150.000. Bei Entzug der Detergentien polymerisiert also die Reduktase ohne Änderung ihrer Aktivität, wie auch die vorgenannten Autoren berichteten.

3.2 Michaeliskonstante und Maximalgeschwindigkeit der lys-Reduktase/try-Cyt.b₅-Reaktion und der Autoxidation

3.2.1 Die Reaktion lys-Reduktase/try-Cyt.b₅
Die Michaeliskonstante der Reduktase/Cyt.b₅-Reaktion wurde ermittelt unter anaeroben Bedingungen durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit der Cyt.b₅-Reduktion bei verschiedenen Cyt.b₅-Konzentrationen.

Reduktase-Konz. (M)	v _{max} (μM b ₅ /min)	Wechselzahl (min ⁻¹)	K _M (μM)
0.5 · 10 ⁻⁹	29.4	58.800	15.4
1 · 10 ⁻⁹	62.5	62.500	20
2.5 · 10 ⁻⁹	166.7	66.700	33

Die Wechselzahl der Reduktase zu Cyt.b₅ ist also ebenso gross wie die zu Ferricyanid. Die im üblichen NADH-Cyt.b₅-Reduktase-Test im Vergleich zu FeCy niedrigere Aktivität beruht darauf, dass wegen der hohen K_M der b₅-Reduktase zu Cyt.b₅ das Enzym nicht mit Cyt.b₅ gesättigt wird im Gegensatz zu FeCy.

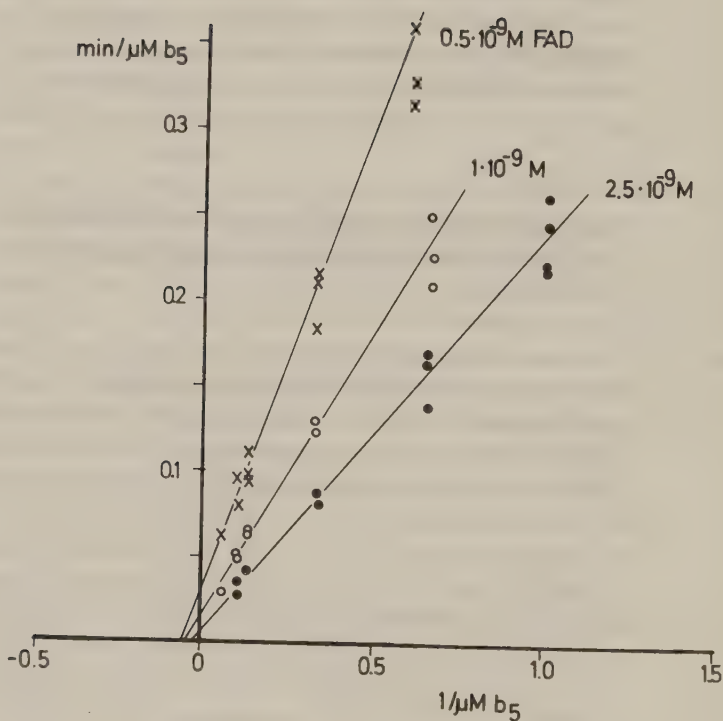


Abb. 22 Lineweaver-Burk -Plot zur Bestimmung von K_M und v_{max} der Reduktase-Cyt. b_5 -Reaktion
2 mM NADH, lys-Reduktase $0.5 \cdot 10^{-9} M$,
 $1 \cdot 10^{-9} M$, $2.5 \cdot 10^{-9} M$.

3.2.2 Die Autoxidations-Reaktionen

3.2.2.1 lys-Reduktase

In der verschlossenen Kuvette wurden die Parameter der Autoxidation gemessen, indem nach Zugabe von 5 mM NADH, Reduktase und ggf. Cyt. b_5 der Sauerstoffverbrauch aufgezeichnet wurde. Im Abstand von 5 Min.

wurde durch Anlegen einer Tangente an die Kurve die Geschwindigkeit bestimmt.

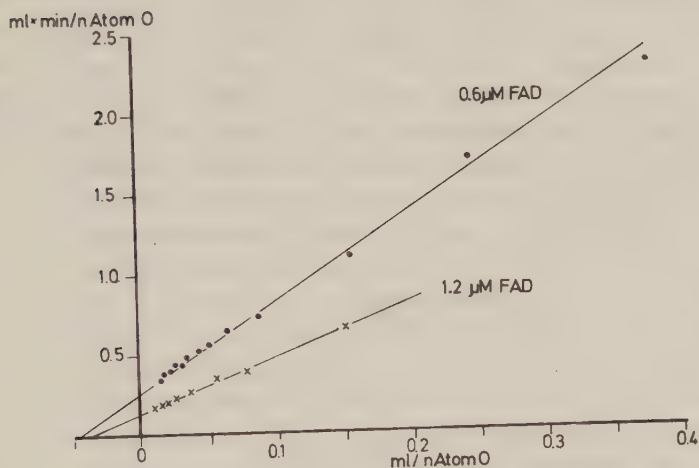


Abb. 23 LINEWEAVER-BURK -Plot der Autoxidation von Reduktase
0.1 M TRAP pH 7.0, 5 mM NADH, 25°C

Reduktase (μM)	v_{max} $\left(\frac{\text{nAtom O}}{\text{ml} \cdot \text{min}}\right)$	turnover $\left(\frac{\text{nAtom O}}{\text{nMol Red.} \cdot \text{min}}\right)$	K_M $\left(\frac{\text{nAtom O}}{\text{ml}}\right) (\mu\text{M O}_2)$
0.6	4	6.7	22 11
1.2	6.3	5.25	25 12.5

Der gemittelte turnover der lys-Reduktase mit Sauerstoff von 6 nAtom O/nMol Reduktase/min (bzw. 3 nMol O₂/nMol Reduktase/min) beträgt etwa 0.01% des turnovers der Reduktase zum FeCy.

3.2.2.2 Cytochrom b₅

Nr.	Cyt.b ₅	(μM)	v_{max} ($\frac{\text{nAtom O}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$)	turnover ($\frac{\text{nAtom O}}{\text{nMol b}_5 \cdot \text{min}}$)	K_M ($\frac{\text{nAtom O}}{\text{ml}}$)	($\mu\text{M O}_2$)
1	det-Cyt.b ₅	2.8	3.08	1.10	16	8
2	"	5.6	6.25	1.12	12.8	6.4
3	lys-Cyt.b ₅	7.0	8	1.14	15.3	7.65
4	"	7.0	10.9	1.55	12.3	6.15
5	"	10.5	12	1.15	12.3	6.15
6	"	10.5	14.3	1.36	13.1	6.55

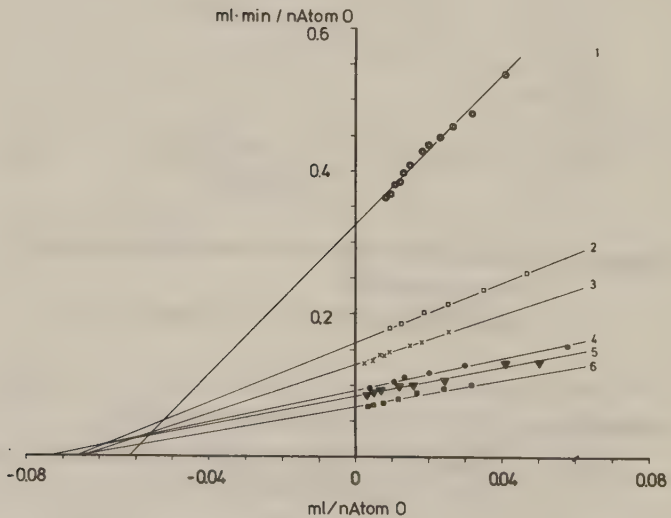


Abb. 24 LINEWEAVER-BURK -Plot der Autoxidation von
Cyt.b₅
0.1 M TRAP pH 7.0, 5 mM NADH, 0.003 μM
Reduktase, 25° C.

Die Geschwindigkeit der Autoxidation des det-Cyt.b₅ ist etwa so gross wie die des try-Cyt.b₅ mit 1.1 - 1.3 nAtom O/nMol Cyt.b₅/min (bzw. 0.6 nMol O₂/nMol Cyt.b₅/min). Die Michaeliskonstante ist durchschnittlich 7 μ M O₂.

Eine Verdoppelung der Reduktase-Konzentration auf 0.006 μ M beeinflusste die Autoxidationskinetik nicht.

3.2.2.3

Katalase-Zugabe und Stöchiometrie NADH:Sauerstoff
Falls durch die Autoxidation stabiles H₂O₂ entstünde, sollte bei Katalase-Zugabe 50% des verbrauchten Sauerstoffs wieder entstehen und die Autoxidationsgeschwindigkeit (gemessen als O₂-Verbrauch) um die Hälfte verringert werden. Bei der Reduktase- und Cyt.b₅-Autoxidation wird aber nur 10 - 25% O₂-Regeneration nach Katalase-Zugabe beobachtet, die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt auf 60 - 70% der ursprünglichen. Das H₂O₂ ist also nicht stabil, sondern reduziert sich unter den gegebenen Bedingungen weiter. Die Geschwindigkeit der Reaktion von H₂O₂ mit reduziertem Flavin und Cytochrom ist aber geringer als die von Sauerstoff, da sonst 0% O₂ regeneriert würde.

Die bei der Autoxidation gemessenen kinetischen Konstanten beziehen sich also auf ein O₂/H₂O₂-Gemisch. Da es sich aber zeigt, dass die Michaeliskonstanten nach Katalase-Zugabe unverändert sind, die Reaktion mit H₂O₂ nicht nur eine geringere v_{max}, sondern auch eine grössere K_M besitzt, ist es erlaubt, die gemessenen Konstanten auf die Sauerstoffreaktion zu beziehen.

Die geringere Geschwindigkeit der H₂O₂-Reaktion zeigt ebenfalls in 3.3.1 die stöchiometrische Oxidation von reduziertem Cyt.b₅ durch luftgesättigtem Puffer.

Die Wirkung der Katalase-Zugabe beweist auch, dass die Präparationen von Reduktase und Cyt.b₅ frei von Katalase-Aktivität sind. Gleichzeitige Messung von Sauerstoff- und NADH-Verbrauch während der Autoxidation gibt über den blossen Sauerstoffumsatz hinaus Aufschluss über den Fluss reduzierender Äquivalente.

	Δ NADH	Δ O ₂	$\frac{\Delta \text{NADH}}{\Delta \text{O}_2}$
<u>Mikrosomen</u>			
ohne Katalase	6.9 - 9.4 ($\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}}$)	3.55 - 4.75 ($\frac{\text{nMol O}_2}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}}$)	0.5
mit Katalase	6.9 - 9.4	3.55 - 4.75	0.5
<u>lys-Reduktase</u>			
ohne Katalase	4.1 - 4.8 ($\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{nMol Red.}}$)	2.85 - 3.2 ($\frac{\text{nMol O}_2}{\text{min} \cdot \text{nMol Red.}}$)	0.4
mit Katalase	4.1 - 4.8	2.0 - 2.4	0.5
<u>try-b₅</u>			
ohne Katalase	0.75 - 0.85 ($\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{nMol b}_5}$)	0.55 - 0.65 ($\frac{\text{nMol O}_2}{\text{min} \cdot \text{nMol b}_5}$)	0.35
mit Katalase	0.75 - 0.85	0.48 - 0.43	0.5

Während bei der Reduktase- und b₅-Autoxidation das NADH:Sauerstoff-Verhältnis von 0.35 auf 0.5 bei Katalase-Zugabe ansteigt, ist bei Mikrosomen kein Effekt messbar, was auf eine Verunreinigung der Mikrosomen-Präparation mit Katalase hinweist. Das NADH:Sauerstoff-Verhältnis von 0.5 zeigt die Reduktion des O₂-Moleküls zu H₂O, das Verhältnis von 0.35 entspricht der Reduktion zu H₂O₂ und der teilweisen Weiterreduktion des entstandenen Peroxids.

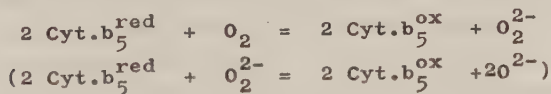
3.3

Das Redox-Verhalten der Komponenten des Cyt.b₅- Systems in Anoxie

3.3.1

Notwendigkeit der quantitativen Sauerstoffentfernung
Durch mehrfaches Evakuieren und Begasen mit O₂-
gereinigtem Stickstoff lässt sich der Sauerstoff nicht
quantitativ entfernen. Durch Zugabe von Glucose-
Oxidase, Glucose und Katalase zur Mess-Küvette wird
zwar in der Messlösung der Sauerstoff entfernt, aber
bei Redoxtitration mit luftgesättigten Lösungen.
reicht die Zugabe von nur 1/200 des Volumens der
Messlösung (1 ml) aus, um durch den Fluss reduzie-
render Äquivalente von Reduktase und Cyt.b₅ zum
Sauerstoff das Gleichgewicht zu verändern. Solche
Titrationskurven gleichen völlig den aeroben Tit-
rationen, nur sind sie um 10 - 15 mV zu positiverem
Potential verschoben.

Wird zu Cyt.b₅ in luftgesättigter Lösung Dithionit
gegeben, so reagiert es mit Luftsauerstoff, bevor
das Cyt.b₅ reduziert wird. Das reduzierte Cytochrom
lässt sich dann wieder durch Zugabe von luftge-
sättigtem Puffer reduzieren. Hierbei oxidieren
1 µl luftgesättigter Puffer etwa 0.5 nMol Cyt.b₅.
Aus dieser Stöchiometrie geht hervor, dass die
Autoxidation des Cytochrom das Sauerstoffmolekül zu
H₂O₂ reduziert, das selbst nur sehr viel langsamer
weiterreduziert wird (siehe 3.2.2.3)



Nur durch Zusatz von GOD, Glucose und Katalase zu
allen benutzten Lösungen lassen sich bei der Tit-
ration anaerobe Bedingungen erreichen.

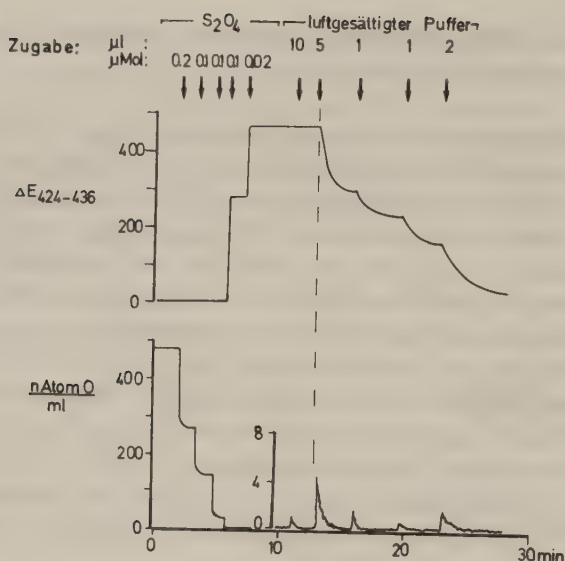


Abb. 25 Reduktion von Cyt. b_5 mit Dithionit und Oxidation durch Zugabe von luftgesättigtem Puffer

3.3.2

Oxidierende Äquivalente in Oxalacetat- und Pyruvatlösung

Bei den anaeroben Redox titrationen von Reduktase und Cyt. b_5 mittels NAD, LDH bzw. MDH, Lac/Pyr bzw. Mal/Oxac zeigte es sich, dass in den mit GOD anaerob gehaltenen Lösungen von Pyruvat und Oxalacetat oxidierende Äquivalente vorhanden sind, die auf nicht-enzymatischem Weg von reduzierter Reduktase und Cyt. b_5 Elektronen abziehen. GOD-haltiger Puffer alleine hat keinen Effekt. Diese Oxidation ist nur dann sichtbar, wenn die Reduktion über das Dehydrogenase-System langsamer ist als die direkte Oxidation. Da bei Pyruvatzugaben im LDH-System die NADH-

Konzentration durch die Potentialerhöhung vermindert wird, ist auch die Reduktionskinetik langsamer. Daher ist neben der Oxidation durch Erhöhung des Redoxpotentials an der Reduktase eine vorübergehende 'überschiessende' Oxidation zu sehen, an die sich eine Reduktion zum Gleichgewicht hin anschliesst. Ebenso wirkt Zusatz von Oxalacetat im MDH-System, während Pyruvat im MDH-, sowie Oxalacetat im LDH-System geringere Oxidation bewirken.

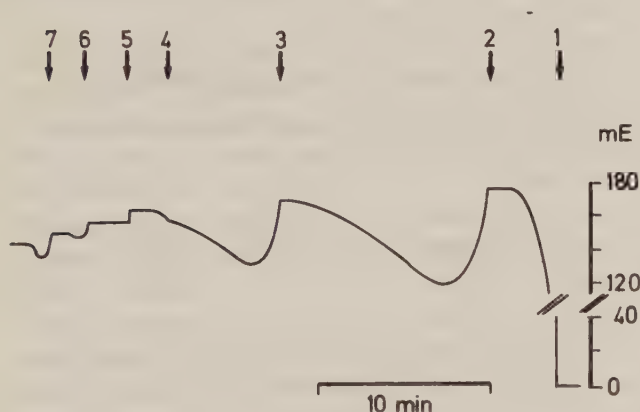


Abb. 26 Messung der Extinktionsdifferenz ΔE (424 - 436 nm)
 1.5 μM try-b₅, 0.05 μM lys-Reduktase
 1 μM LDH, 0.7 mM NAD, 1 ml 0.1 M TRAP-Puffer
 pH 7.0 mit GOD (anaerob)
 Zeitvorschub von rechts nach links
 Zugabe: (1) 0.5 λ Lac (100 mM)
 (2) 30 λ Pyr (300 mM)
 (3) 30 λ Oxac (300 mM)
 (4) 20 λ Lac (100 mM)
 (5) 30 λ GOD-Puffer
 (6) 30 λ Oxac (300 mM)
 (7) 30 λ Pyr (300 mM)
 Bei GOD-Zugabe ist eine Extinktionsabnahme sichtbar, welche auf einem Verdünnungssprung beruht.

Der Gehalt an oxidierenden Äquivalenten beträgt etwa 1 nMol pro 100 μ Mol Oxalacetat bzw. Pyruvat (10 ppm) bei allen erhältlichen p.a.-Substraten. Diese oxidierenden Äquivalente sind bei aeroben Redox titrationen nicht sichtbar, weil im steady-state eine so geringe Oxidation zusätzlich zu dem Fluss zum Sauerstoff nicht ins Gewicht fällt. Ausserdem müssen bei den anaeroben Titrationen erheblich positivere Potentiale eingestellt werden, was hohe Konzentrationen an Pyruvat bzw. Oxalacetat bedingt.

3.3.3 Das Redox-Verhalten der lys-Reduktase

3.3.3.1 Die Reduktion des Flavins durch NADH/NAD

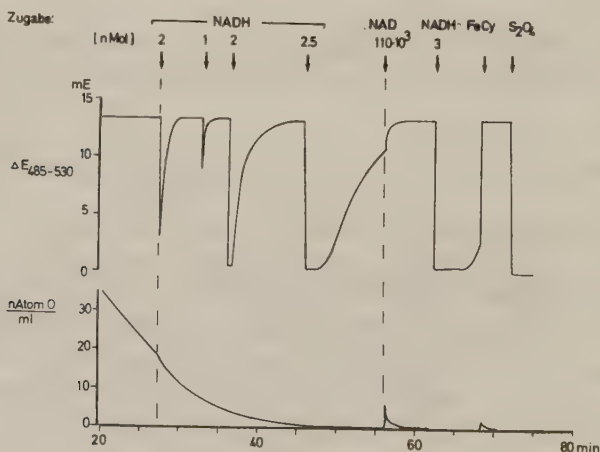


Abb. 27 oben: Wellenlängendifferenz $\Delta 484 - 530$ nm
 2 μ M lys-Reduktase, 1 ml 0.1 M TRAP
 pH 7.0 mit GOD
 Der Verdünnungssprung bei NAD-Zugabe
 ist korrigiert.

unten: Sauerstoffelektrode

Die Reduktase lässt sich mit stöchiometrischen Mengen NADH nicht voll reduzieren, so lange noch mehr als 2.5 μM O_2 vorhanden sind. Auch bei geringem O_2 -Gehalt ist die Reduktion nur vorübergehend. Die Oxidationskinetik wird mit abnehmendem O_2 -Gehalt zwar langsamer, bleibt aber auch in völlig anaerober Lösung bei etwa 0.2 nMol Flavin/min. Dieser Wert könnte durch O_2 -Diffusion aus der Luft in die Lösung bedingt sein. Die anaerobe Messung bestätigt die Stöchiometrie.



2 nMol NADH reichen gerade aus, um die 2 nMol FAD kurze Zeit vollständig zu reduzieren. 2.5 nMol NADH reduzieren das FAD um so viel länger, als die Oxidation von 0.5 nMol NADH durch Sauerstoff Zeit benötigt. Im Bereich von 2 - 15 nMol NADH gilt etwa die Beziehung: Völlige Oxidation während des Zeitraums $(N - 2) \cdot 5$ Minuten bei Zugabe von N nMol NADH (bei 2 nMol Reduktase).

Zusatz von NAD beeinflusst die Reduktion der Reduktase und die Oxidationskinetik nicht. Bei einem Verhältnis NAD/NADH von etwa 37.000, das einem Redoxpotential von - 179 mV entspricht, ist die Reduktase noch zu 100% reduziert, das Mittelpotential muss also noch erheblich positiver sein. Eine Redox-Titration der Reduktase mit NAD/NADH lässt sich also wegen der grossen Differenz der Mittelpotentiale von Reduktase und NAD nicht durchführen.

- 3.3.3.2 Das Mittelpotential der lys-Reduktase bei Redox-
titration mit Lac/Pyr und Mal/Oxac
Werden die Titrationsgleichgewichte der Abb. 27 als $\log \frac{\text{ox}}{\text{red}}$ gegen das Redox-Potential $E_{\text{M/O}}$ aufgetragen (Abb. 28), so liegen die Werte in guter Näherung

auf einer Geraden mit der Steigung 29 mV pro $\Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$. Dies entspricht dem für das Flavin nach



zu erwartenden $n = 2$ der Nernst-Gleichung. Das Mittelpotential der Reduktase ist - 109 mV.

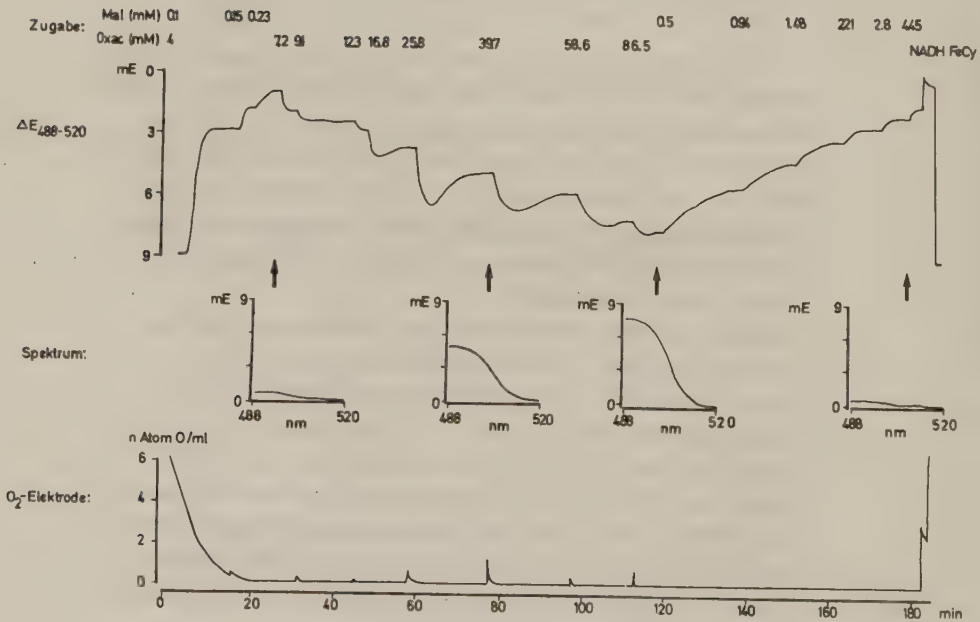


Abb. 28 Titration von 1.3 μM Reduktase mit Malat/Oxac. 1 ml 0.1 M TRAP pH 7.0 (+GOD), 25°C, MDH 5 μM b.s. NAD 2 mM. Die Extinktionskurve ist korrigiert bei Oxac-Zugabe hinsichtlich der Eigenextinktion der Oxac-Lösung

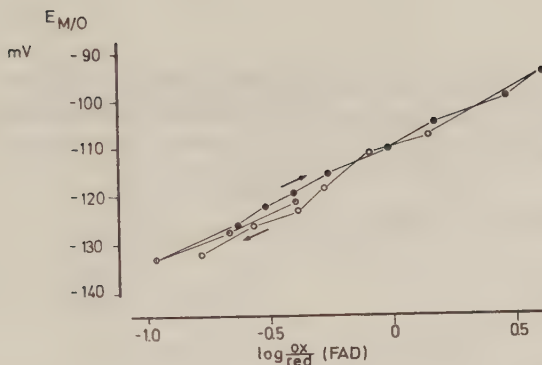


Abb. 29 Redox Titration der lys-Reduktase mit Mal/Oxac (siehe Abb. 28)
Die Richtung der Titration ist durch Pfeile wiedergegeben.

Die Titrations sind reversibel. Die 'überschießende' Oxidation bei Oxac-Zugabe ist aufgrund der oxidierenden Äquivalente in der Oxac-Lösung zu erklären. Die Reduktionskinetik nach Malatzugabe wird mit Erhöhung des Malat/Oxalacetat-Verhältnisses schneller.

Redox Titrationen der Reduktase mit Lactat/Pyruvat sind ebenfalls reversibel und in der üblichen Auftragung linear mit 28 - 30 mV pro $\Delta \log \frac{\text{Ox}}{\text{Red}} = 1$, also $n = 2$. Das Mittelpotential ist wie bei den aeroben Titrations (siehe 3.5.3.1) um 4 - 7 mV positiver als bei Mal/Oxac-Titrations und liegt zwischen - 102 und - 105 mV.

Die Lage der Titrationskurven ist unabhängig von der Konzentration an NAD, Reduktase und Dehydrogenase.

3.3.3.3 Kinetik der Flavin-Reduktion

Die Geschwindigkeit der Flavin-Reduktion ist abhängig vom NADH-Spiegel. Bei festem L/P-Verhältnis

erhöht sich die Reduktionsgeschwindigkeit des Flavins durch NAD-Erhöhung. Die NADH-Konzentration errechnet sich nach

$$[NADH] = [NAD] \cdot 10^{\frac{E'_0 - E}{29}}$$

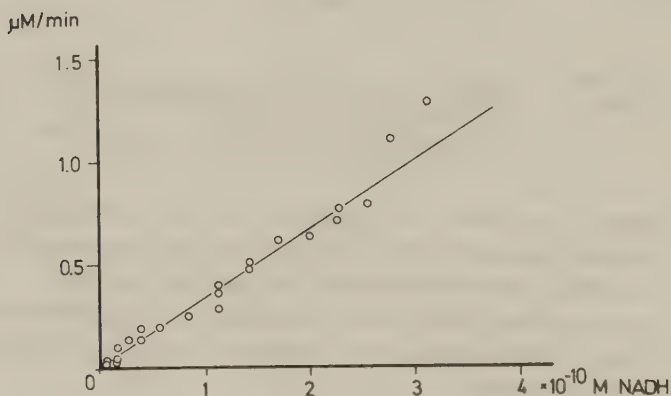


Abb. 30 Reduktionsgeschwindigkeit des Flavins in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration
 NAD 0.001 - 0.1 mM, 1 μM LDH
 $E'_{L/P} = -155$ mV, 0.8 μM lys-Reduktase
 Wellenlängendifferenz Δ 488 - 520 nm.

Im gemessenen Bereich bis $3 \cdot 10^{-10}$ M NADH besteht ein linearer Zusammenhang zwischen NADH-Konzentration und Anfangsgeschwindigkeit der Flavin-Reduktion. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt 0.33 μM FAD reduziert/min/ $1 \cdot 10^{-10}$ M NADH. Diese Anfangsgeschwindigkeiten eignen sich nicht für einen Lineweaver-Burke-Plot, denn sie sind wegen der Konzentration an NAD (Produkt) keine 'initial velocity rates' nach der Definition von MICHAELIS und MENTEN.

Die Kinetik der Reduktion ist 0. Ordnung. Die Reduktionsgeschwindigkeit ist linear bis zu einem Reduktionsgrad von etwa 75%, hier geht sie in eine Reaktion 1. Ordnung über.

3.3.3.4 pH-Abhängigkeit des Mittelpotentials der lys-Reduktase

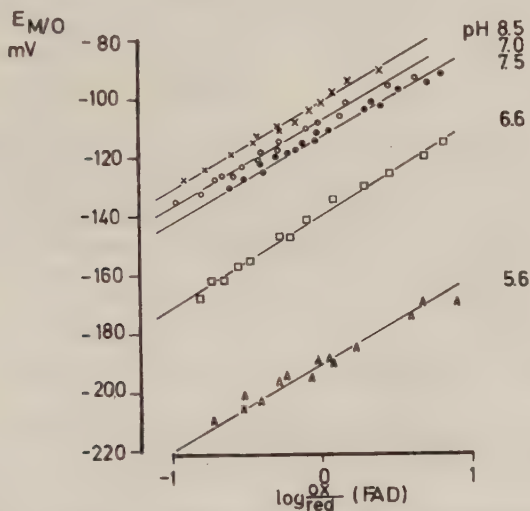


Abb. 31 Anaerobe Redoxtitration der Reduktase bei verschiedenen pH-Werten.
1 ml Puffer, 1.3 μ M Reduktase, 5 μ M MDH b.s.
2 mM NAD.
Aufgetragen ist als $E_{M/O}$ das Potential des Mal/Oxal-Paares mit $E'_O = -170$ mV.

Korrigiert man die Reduktase-Potentiale der Abb. 31 hinsichtlich der pH-Abhängigkeit des Mal/Oxal-Paares (-59 mV/pH), so ergeben sich für die wahren Mittelpotentiale der Reduktase folgende Werte:

pH	E_o FAD (errechnet mit E_o M/O = -170 mV)	E'_o M/O	E'_o FAD	n
5.6	- 191 mV	- 87.4 mV	- 108.4 mV	2
6.6	- 140	-146.4	- 106	2
7.0	- 109	-170	- 109	2
7.5	- 113	-199.5	- 142.5	2
8.5	- 101	-258.5	- 189.5	2

Man sollte für das Flavin eine pH-Abhängigkeit von - 59 mV pro pH erwarten, Die Reduktase zeigt diese pH-Abhängigkeit bei einem pH > 7.0, ist aber der pH < 7.0, bleibt das Mittelpotential etwa konstant.

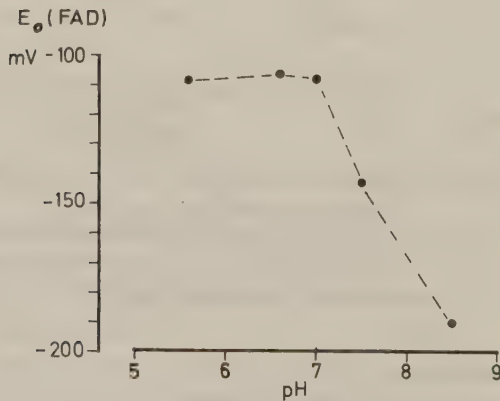


Abb. 32 pH-Abhängigkeit des Mittelpotentials der Reduktase

3.3.4 Das Redoxverhalten des Cyt.b₅

3.3.4.1 Redox Titration und Reduktionskinetik des mikrosomalen Cyt.b₅

Die Titration in Abb. 33 zeigt, dass sich mit Lactat/Pyruvat ein definierter Reduktionsgrad des Cyt.b₅

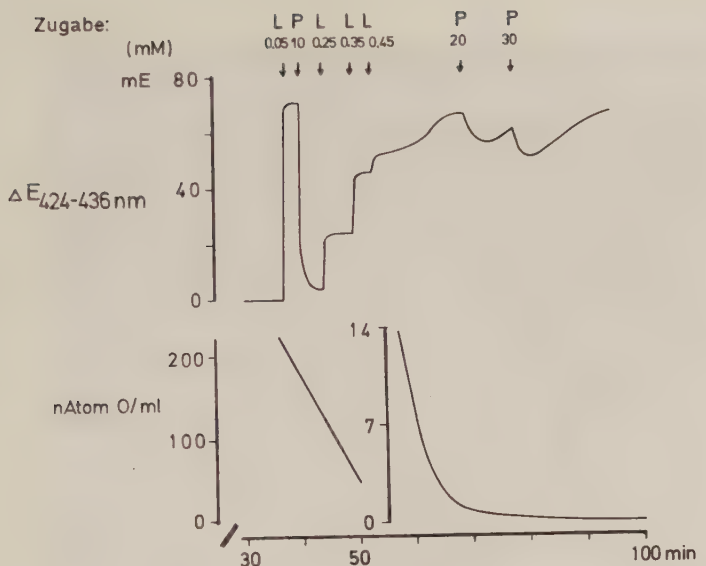


Abb. 33 oben: Extinktionsdifferenz der Wellenlängen $\Delta 424 - 436 \text{ nm}$

unten: Sauerstoffelektrode

Referenzküvette: Mikrosomenlösung ohne LDH

Messküvette: in der 25. Minute GOD-Zugabe

einstellen lässt, so lange der Sauerstoff noch nicht völlig eliminiert ist. Sobald aber die Küvette anaerob ist, wird durch die Redoxtitration keine stabile Oxidation des Cyt. b_5 mehr erreicht. Die vorübergehende Oxidation beruht auf den oxidierenden Äquivalenten in der Pyruvatlösung. Das Lac/Pyr- und das Mal/Oxac-Verhältnis lässt sich nur bis zu einem Wert von etwa 1:1000 erniedrigen, was einem Potential von - 90 bzw. - 80 mV entspricht. Bei solch kleinem L/P- und M/O-Verhältnis und bei kleiner NAD-Konzentration ist die b_5 -Reduktion sehr langsam und kann 12 - 15 Std. dauern. Auf jeden Fall jedoch stellt sich das Cytochrom im Gleichgewicht auf den Reduktionsgrad 100% ein.

Die anaerobe Reduktionsgeschwindigkeit des mikrosomalen Cyt. b_5 ist linear abhängig von der NADH-Konzentration im gemessenen Bereich bis $1 \cdot 10^{-10}$ M NADH, wie Abb. 33 zeigt. Bei einem festen Mal/Oxac-Verhältnis von 1 : 160 (Redoxpotential = 112 mV) entspricht die Konzentration von 0.1 mM NAD einer NADH-Konzentration von $0.12 \cdot 10^{-4} \mu$ NADH. Die Reduktionsgeschwindigkeit ist $0.11 \mu\text{M Cyt.}b_5 \text{ red/min} / 1 \cdot 10^{-4} \mu\text{M NADH}$ (2 $\mu\text{M MDH}$)

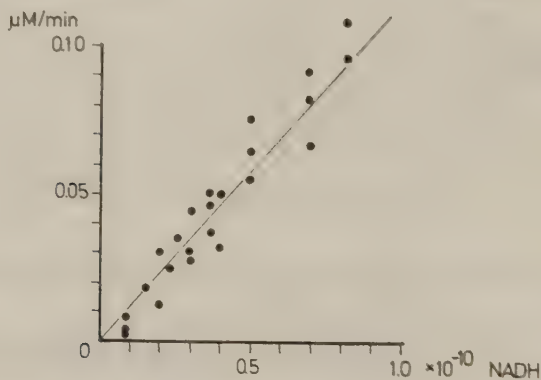


Abb. 34: Anaerobe Reduktionsgeschwindigkeit des mikrosomalen Cyt. b_5 in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration, errechnet aus der NAD-Konzentration und dem Redox-Potential. 2 $\mu\text{M MDH b.s.}$, 2 mg Mikrosomen, 1 ml TRIS, 0.1 M, pH 7.0 + GOD
Mal: 0.1 mM, Oxac: 16 mM, NAD: 0.06 bis 0.8 mM

Die Kinetik der Reduktion ist 0. Ordnung bis zu einem Reduktionsgrad des Cyt. b_5 von etwa 80%. Bei sehr kleiner NAD-Konzentration wie auch bei kleinen Lac- oder Mal-Konzentrationen war die Reduktionsgeschwindigkeit unmittelbar nach der Zugabe oft schneller und ging erst nach 0.5 - 1 Minute in die lineare Reduktionskinetik über.

3.3.4.2 Redox titrationen und Reduktionskinetik des isolierten Cyt. b_5

det-Cyt. b_5 und try-Cyt. b_5 zeigen in der anaeroben Küvette bei der Titration die gleichen Eigenschaften wie das mikrosomale Cyt. b_5 . Beide lassen sich durch kein L/P-Verhältnis bis zum Potential - 80 mV stabil oxidieren.

Die Reduktionsgeschwindigkeit ist abhängig vom Redoxpotential, von der NAD-Konzentration und von der Reduktase-Konzentration, bei gleicher Reduktase-Konzentration also vom NADH-Spiegel. Die Kinetik ist linear (o. Ordnung) bis zu einem Reduktionsgrad von etwa 90%. Es besteht eine lineare Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von der NADH-Konzentration bis $30 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$ NADH, sowohl bei Zugabe von NAD zu einem konstanten $E_{L/P}$, wie auch bei Titration einer festen NAD-Konzentration mit Lac/Pyr.

a) Titration mit Lac/Pyr (NAD 2.6 mM, LDH $1 \mu\text{M}$, try-Cyt. b_5 $1 \mu\text{M}$)

0.02 μM lys-Reduktase, $v = 0.115 \mu\text{M}$ Cyt. b_5 /min/ $10 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$ NADH

0.04 μM lys-Reduktase, $v = 0.225 \mu\text{M}$ Cyt. b_5 /min/ $10 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$ NADH

b) Titration mit NAD ($E_{L/P} = - 117 \text{ mV}$)

0.02 μM lys-Reduktase, $v = 0.15 \mu\text{M}$ Cyt. b_5 /min/ $10 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$ NADH

0.04 μM lys-Reduktase, $v = 0.335 \mu\text{M}$ Cyt. b_5 /min/ $10 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$ NADH

Verdoppelung der Reduktase-Konzentration verdoppelt also die Reduktionsgeschwindigkeit. Die Titrationen mit NAD unter gleichen Bedingungen führen zu höheren Reduktionsgeschwindigkeiten als die Titrationen mit Lac/Pyr. Die Ursache kann in einer 1.5-fach niedrigeren NADH-Konzentration bei der L/P-Titration liegen. Dieser Faktor 1.5 entspricht einer Abweichung der Mittelpotentialdifferenz Lac/Pyr-NADH/NAD um 5.1 mV von der zugrunde gelegten Mittelpotentialdifferenz 233 mV.

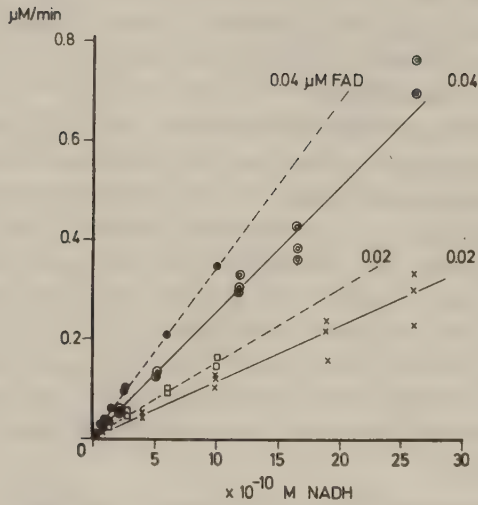


Abb. 35 Abhängigkeit der anaeroben Reduktionsgeschwindigkeit des try-Cyt. b_5 von der NADH-Konzentration

- - - Titrationen mit NAD

— Titrationen mit Lac/Pyr

3.4 Potentiometrische Titration des isolierten Cyt.b₅

In der anaeroben Küvette wird Cyt.b₅ titriert durch Reduktion mit Dithionit und Oxidation mit Ferri- cyanid. Über eine Kette von Redox-Mediatoren stellt sich ein Redox-Gleichgewicht mit der Platinelektrode ein, an der das Potential gemessen wird.

In der Auftragung $\log \frac{\text{ox}}{\text{red}}$ (Cyt.b₅) gegen das Redox- potential der Platinelektrode lässt sich eine Gerade durch die Werte legen. Es ergibt sich ein Mittelpotential des Cyt.b₅ von

$$E'_0 = + 6 \text{ mV}$$

und eine Steigung von $61 \text{ mV} / \Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$, also $n = 1$.

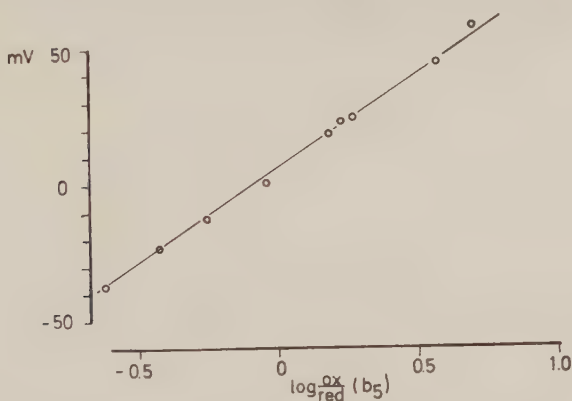


Abb. 36 Titration von Cyt.b₅ an der Platinelektrode mit DT und FeCy in 0.1 M TRIS, pH 7.0
3.2 μM Cyt.b₅, Wellenlängendifferenz $\Delta 556 - 575 \text{ nm}$

Zugabe von 1 μM Reduktase beeinflusst die Redox- titration nicht, das Cyt.b₅-Mittelpotential ist unverändert. Wird die Cyt.b₅-Lösung nicht mit DT und FeCy titriert, sondern durch Zusatz von Lactat/

Pyruvat, LDH, NAD und Reduktase, so ist die Reduktionskinetik des Cyt.b₅ sehr stark verlangsamt. Es besteht kein Gleichgewicht zwischen dem Lactat/Pyruvat-Potential und dem Potential an der Platinelektrode. Das Redoxpotential zwischen Cyt.b₅ und Platinelektrode stellt sich durch einen erheblichen Fluss von reduzierenden Äquivalenten vom Cytochrom zu den Redoxmediatoren ein. Die Titrationskurve verschiebt sich zum negativeren Potential und wird gekrümmt, da die Konzentrationsänderung des Redox-Puffers bei kleinem Quotienten Ox/Red der Redox-Mediatoren nicht mehr zu vernachlässigen ist. Diese so veränderte Titrationskurve ist bei Oxidation mit Pyruvat und Reduktion mit Lactat reversibel.

3.5 Das Redox-Verhalten der Komponenten des aeroben
Cyt.b -Systems

- 3.5.1 Redox Titration von NAD mit Lactat/Pyruvat
Durch Lactat/Pyruvat-Titrationen von NAD lässt sich die Differenz der Mittelpotentiale des Lactat/Pyruvat- und des NADH/NAD-Systems, sowie die Kinetik der Gleichgewichtseinstellung messen.

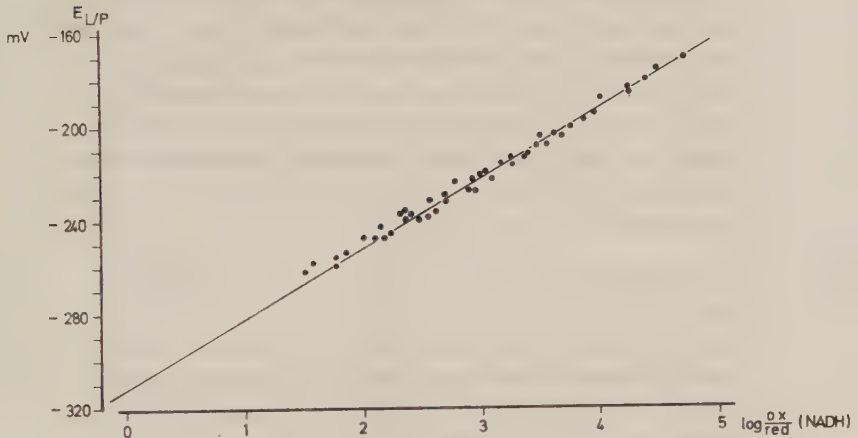


Abb. 37 Lactat/Pyruvat-Titration von NAD unter
aeroben Bedingungen
0.3 μ M LDH, 5 mM NAD, 1 ml TRAP 0,1 M, pH 7.0
25° C
Messung $\Delta E(340 - 395 \text{ nm})$

Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt sowohl bei Reduktion mit Lactat, sowie bei Oxidation mit Pyruvat innerhalb einer Minute. Die Titrationen sind vollständig reversibel. Die NADH-Menge ist gegenüber dem

Redoxpuffer Lactat/Pyruvat wegen der grossen Konzentration an NAD nicht mehr vernachlässigbar klein. Daher muss bei hohem L/P-Verhältnis das Redox-Potential korrigiert werden unter Berücksichtigung der Reduktionsäquivalente, die zum NADH geflossen sind.

Das Experiment bestätigt die Nernst-Gleichung für die Gleichgewichtseinstellung zwischen $E_{L/P}$ und $E_{NAD/NADH}$. Die Differenz der Mittelpotentiale ist 133 mV. Bei einem zugrunde gelegten Mittelpotential des Lactat/Pyruvat-Paares von - 180 mV ist das NADH/NAD-Mittelpotential - 313 mV. Der Faktor n der Nernst-Gleichung ist $n = 2$.

Die Linearität der Redoxtitration im Bereich $\log \frac{ox}{red} = 4$ bis 5 zeigt, dass die zusätzliche Extinktion des an die Dehydrogenase gebundenen NADH gegenüber der des freien NADH vernachlässigt werden kann.

3.5.2 Das scheinbare Mittelpotential des mikrosomalen Cyt.b₅

Da die gewaschenen Mikrosomen noch etwas endogenes Substrat besaßen, wurde mit NAD und LDH Cyt.b₅ vorübergehend zu etwa 95% reduziert. Nach etwa 5 - 6 Minuten lag Cyt.b₅ aufgrund der Autoxidation wieder in der oxidierten Form vor. Die Autoxidation der Mikrosomen mit 5 mM NADH beträgt 6 - 9 nAtom O/min/mg Protein, bei einem L/P von 1 war sie etwa 3 nAtom O/min/mg Protein (NAD 5 mM). Trotz dieser erheblichen Autoxidation der Mikrosomen ergaben die Substratteste nach Säurestop, dass der Abbau von Lactat, d.h. der Verlust reduzierender Äquivalente, innerhalb des Fehlers der Substratbestimmung lag.

Bei der Redox Titration mit Lactat/Pyruvat zeigt es sich, dass die Einstellung des Reduktionsgrades des Cyt.b₅ nach Lactatzugabe langsamer ist als nach Pyruvatzugabe, sie dauert bis zu 4 Minuten. Die erreichten Gleichgewichte der Titrationsstufen, d.h. die eingestellten Reduktionsgrade des Cyt.b₅, sind stabil innerhalb des gemessenen Zeitraums von einigen Minuten. Die Titration des mikrosomalen Cyt.b₅ ist reversibel. Durch die Titrationspunkte lässt sich bei üblicher Auftragung $\log \frac{ox}{red}$ gegen das Redoxpotential $E_{L/P}$ in guter Näherung eine Regressionsgerade legen. Bei dem Reduktionsgrad 50% des Cyt.b₅ entspricht das zugehörige $E_{L/P}$ dem scheinbaren Mittelpotential des Cytochroms.

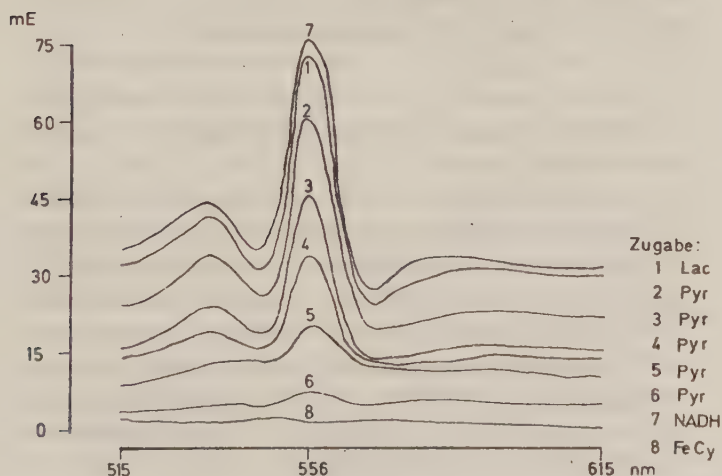


Abb. 38 Registrierung der Differenzspektren 515 - 615 nm
Referenzküvette: identische Lösung ohne LDH
Redox Titration mit Lactat/Pyruvat
4 mg Mikrosomen/ml, 0.1 M TRAP pH 7.0, 25°C
0.7 mM NAD, 3 µM LDH (b.s.)

Zugabe (mM) : 1) Lac 1 2)Pyr 0.8 3)Pyr 1.2 4)Pyr 2.0
5)Pyr 3.6 6)Pyr 5.3 7)NADH 5 8)FeCy 10

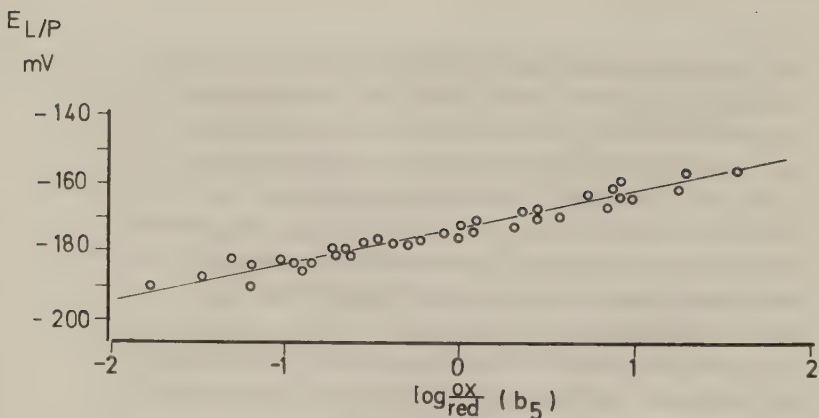


Abb. 39 L/P-Titration des mikrosomalen Cyt. b_5
3 μ M LDH, 0.7 mM NAD

Die Regressionsgerade ergibt ein Mittelpotential $E_a = -173$ mV, die Steigung entspricht $n' = 6$ ($10 \text{ mV} / \Delta \log \frac{ox}{red} = 1$). Dieses scheinbare Mittelpotential des Cyt. b_5 liess sich beeinflussen durch Detergenszusatz und durch Begasen mit Stickstoff.

Durch Zusatz von Detergens werden die Mikrosomen in eine Pseudolösung überführt, in der die membrangebundenen Enzyme solubilisiert sind. Die hohe Konzentration (2%) des anionischen Detergens TRITON ist notwendig, da das ionische Detergens DOC bei pH 7.0 sehr schlecht löslich ist. Die trübe Mikrosomenlösung wird als Pseudolösung transparent und lässt sich dann auch in höheren Konzentrationen photometrieren.

Die Verminderung des Sauerstoff-Gehaltes beeinflusst ebenfalls das scheinbare Mittelpotential des Cyt- b_5 . Dazu wurde die Mikrosomen-Suspension titriert in einer geschlossenen Küvette. Der Puffer und alle Substratlösungen waren mehrfach an der Wasser-

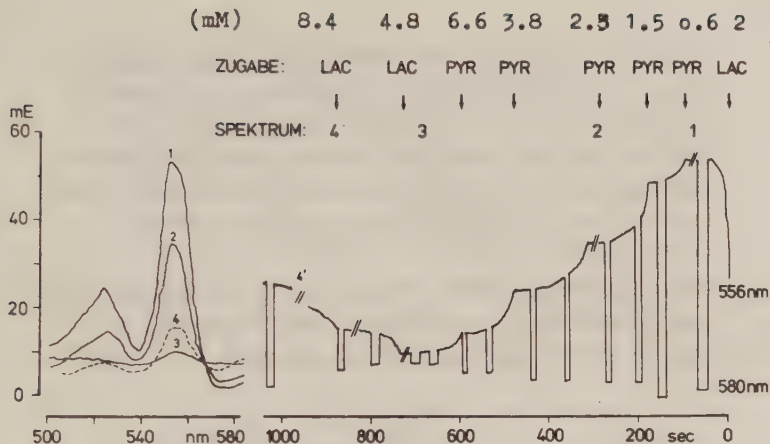


Abb. 40 Lac/Pyr-Titration des mikrosomalen Cyt. b₅ mit Detergens am Cary. Die Wellenlängen wurden während der Titration von Hand zwischen 556 und 580 verstellt. 4 mg Mikrosomen/ml, 2% TRITON-X 100, 0.1 M TRAP pH 7.0, 0.7 mM NAD, 3 µM LDH b.s.

strahlpumpe evakuiert und mit O₂-gereinigtem N₂ (90% N₂ - 10% CO₂) begast. Der Sauerstoffgehalt war maximal 15 nMol/ml und war während der Titration konstant. Es war nicht möglich, ihn während der Titration unter 5 nMol/ml zu senken. Wegen der kleinen K_M von Reduktase und Cyt. b₅ zu Sauerstoff genügen diese Konzentrationen noch, um durch den Autoxidations-steady state das scheinbare Mittelpotential negativ zu halten, allerdings weniger als bei Sauerstoffsättigung der Lösungen.

Bedingung	E _a (b ₅) (mV)	Steigung der Regres- sionsgeraden (mV/Δlog ^{ox} _{red} = 1) $\hat{=}$ n'
Mikrosomen u. Detergens	-182	10 - 15
Mikrosomen	-173	10
Mikrosomen u. Stickstoff	-150	10

n' ist der scheinbare Elektronenübergangskoeffizient, den man erhält bei Anwendung der Nernst-Gleichung auf die vorliegenden Fließgleichgewichte. Es gilt wie beim wahren Elektronenübergangskoeffizienten beim thermodynamischen Gleichgewicht $n' = \frac{59 \text{ (mV)}}{(mV/\Delta \log \text{ox/red} = 1)}$ bei 25°C .

- 3.5.3 Das Redox-Verhalten der isolierten Cyt. b_5 -Reduktase
 3.5.3.1 Das scheinbare Mittelpotential der Reduktase
 3.5.3.1.1 Redox titrationen mit Mal/Oxalacetat

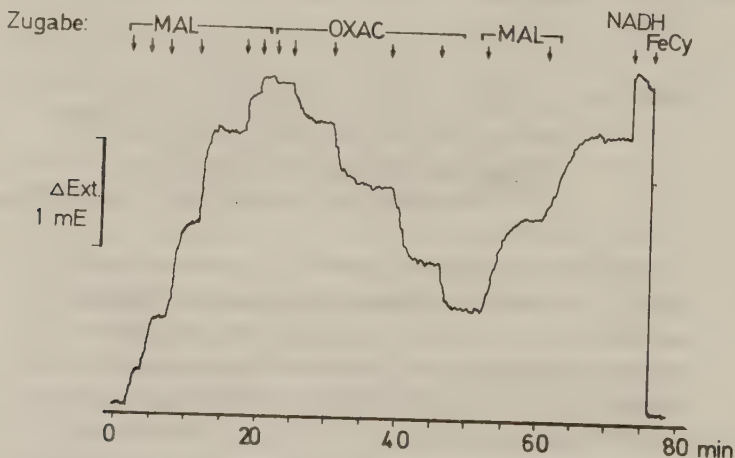


Abb. 41 Messung der Extinktionsdifferenz der Wellenlängen $\Delta 461 - 521 \text{ nm}$
 1 μM MDH, 1 mM NAD, 0.4 μM lys-Reduktase
 Die Abbildung ist korrigiert hinsichtlich der Eigenextinktion der Oxalacetatlösung.

Nach Substratzugabe stellen sich die stabilen Gleichgewichte innerhalb weniger Minuten ein. Die Titration ist reversibel. Trägt man die Titrationspunkte als

$\log \frac{\text{ox}}{\text{red}}$ in üblicher Weise gegen das durch Mal/Oxac eingestellte Potential auf, so ergibt sich eine Kurve, die zum positiven Potential hin schwach konkav gekrümmt ist. Eine Regressionsgerade durch die Punkte ergibt für $\Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$ eine Potentialdifferenz von 14 mV, also $n' = 4$. Die gleiche Kurvenform ergibt die Titration der fünffachen FAD-Konzentration, sie ist aber parallel um etwa 17 mV zum negativen Potential hin verschoben. Das scheinbare Mittelpotential E_a ist bei der Titration mit

0.4 μM	Reduktase	- 146 mV
2 μM	Reduktase	- 161 mV

(1 μM MDH, 1 mM NAD)

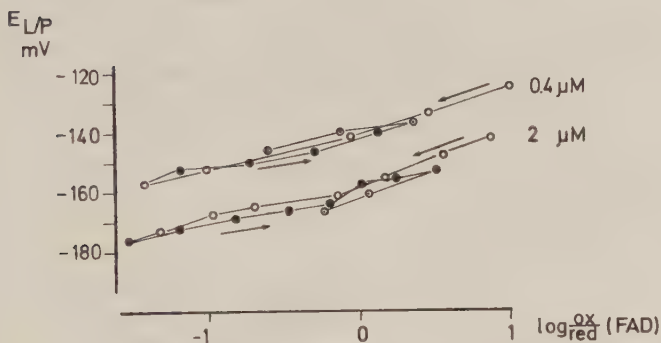


Abb. 42 Mal/Oxac-Titration der isolierten lys-Reduktase. Die Pfeile geben die Richtung der Titration an.
1 mM NAD, 1 μM MDH, 1 ml 0.1 M TRAP, pH 7.0, 25° C.

Es fällt auf, dass bei der Titration von 2 μM Reduktase die Kurve nicht mehr völlig reversibel ist und

sich während der Titration um etwa 5 mV zum negativen Potential verschiebt.

3.5.3.1.2 Redox Titration mit Lactat/Pyruvat

Die Titrationsen wurden gemessen mit Hilfe der Differenzspektren von 445 nm - 505 nm. Die Kinetik der Gleichgewichtseinstellung kann bei diesem Verfahren nicht gemessen werden. Das Gleichgewicht ist dann erreicht, wenn nach 2 Minuten keine Extinktionsänderung mehr eintritt, das Differenzspektrum also gleich Null ist.

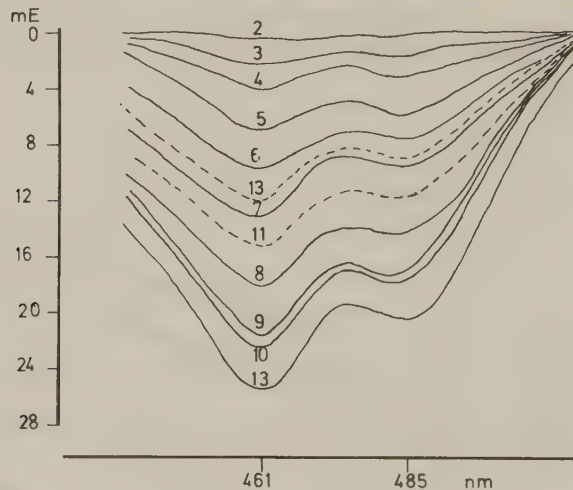


Abb.43 3 μ M Reduktase, 1 μ M LDH (b.s.)
0.7 mM NAD, 0.1 M TRAP pH 7
Differenzspektrum (Spektrum x minus Spektrum 1)

Nr.	Zugabe	Potential	%red
(1)	Pyr	-	(0)
2	Lac	-129	1
3	"	-145	9
4	"	-148	16
5	"	-154	28.5
6	"	-156	28.5
7	"	-158	53
8	"	-163	72.5
9	"	-167	86
10	"	-169	90
11	Pyr	-163	61
12	"	-157	47
13	NADH	(∞)	100

Die Flavinspektren zeigen während der Titration die gleiche Lage der Peaks bei 485 nm und 461 nm, das Verhältnis ihrer Extinktionen bleibt konstant. Eine O_2 -stabile Semichinon-Form ist also spektral nicht sichtbar.

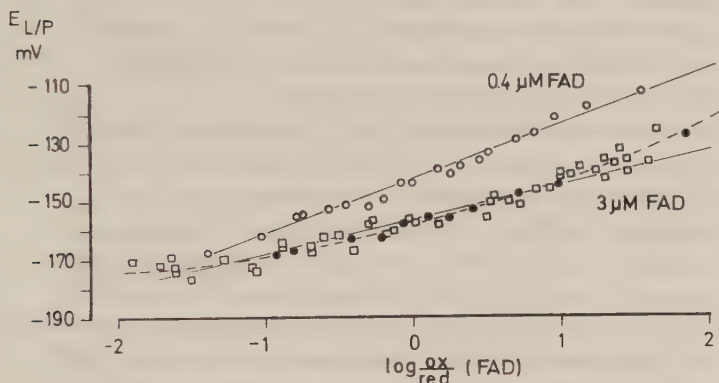


Abb. 44 Lac/Pyr-Titration der lys-Reduktase (=FAD)
LDH 1 μ M b.s., NAD 0.7 mM
● Messwerte der Titration Abb. 43

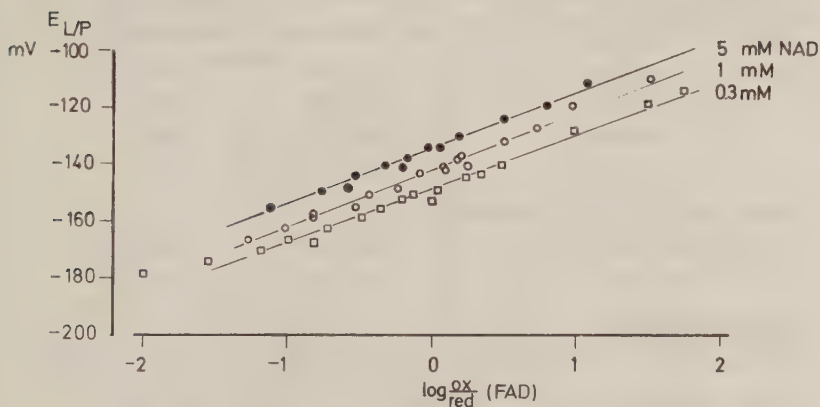


Abb. 45 Abhängigkeit der Reduktase-Titration von der NAD-Konzentration. LDH 1 μ M, FAD 0.4 μ M.

Die Titrationsen sind weitgehend reversibel, abweichend davon zeigt sich jedoch bei der Flavinkonzentration $3 \mu\text{M}$ während der Titration eine Verschiebung zum negativen Potential. Die Lage der Titrationskurven verschiebt sich in Abhängigkeit von der NAD- und der Reduktase-Konzentration. Das scheinbare Mittelpotential E_a wird bei Erhöhung der NAD-Konzentration positiver, bei Erhöhung der Flavinkonzentration negativer.

Trägt man die Werte als $\log \frac{\text{ox}}{\text{red}}$ gegen das Potential $E_{L/P}$ auf, so kann man durch die Punkteschar innerhalb des am genauesten zu messenden Bereichs zwischen $\log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = +1$ (9% FAD reduziert) und $\log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = -1$ (91% FAD reduziert) eine Regressionsgerade legen. Bei den Punkten ausserhalb dieses Bereichs steigt der Messfehler stärker an, so dass die Streuung grösser wird. Daher wird bei der Regressionsgeraden der Bereich ausserhalb $\log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = \pm 1$ vernachlässigt.

L/P-Titration der

lys-Reduktase

LDH $1 \mu\text{M}$ b.s., $0.4 \mu\text{M}$ FAD

5 mM NAD

1 mM NAD

0.7 mM NAD

0.3 mM NAD

LDH $1 \mu\text{M}$ b.s., 0.7 mM NAD

0.4 μM FAD

3 μM FAD

det-Reduktase

NAD 0.7 mM, 0.3 μM FAD

E_a	Regressions-Gerade	
	Steigung ($\text{mV}/\Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$)	
- 134 mV	19 mV	
- 142 mV	18 mV	
- 144 mV	19 mV	
- 149 mV	19 mV	
- 144 mV	19 mV	
- 158 mV	13 mV	
- 145 bis 155 mV	15 - 20 mV	

(Die Titration mit $0.4 \mu\text{M}$ FAD, 0.7 mM NAD ist aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 45 nicht enthalten).

Die Titrations der det-Reduktase waren schwierig, da die bei der Präparation erhaltenen Enzymmengen gering und die Konzentration zu niedrig war. Das scheinbare Mittelpotential streute um 10 mV, liegt aber im entsprechenden Bereich der lys-Reduktase. Vergleicht man die Titrations mit Lac/Pyr und mit Mal/Oxac, so zeigt sich, dass unter gleichen Bedingungen das mit Lac/Pyr gemessene scheinbare Mittelpotential 4 mV positiver ist. Diese Differenz entspricht der in 3.3.3.2 (anaerobe Reduktase-Titration) gemessenen. Die Steigungen der Regressionsgeraden sind bei der [NAD]-Variation konstant und entsprechen etwa $n' = 3$. Sie werden bei Erhöhung der Reduktase-Konzentration flacher $n' = 4 - 5$.

3.5.3.2 Die Abhängigkeit des Reduktionsgrades von der NAD-Konzentration bei konstantem $E_{L/P}$. Analog der NAD-Abhängigkeit des E_a bei L/P-Titration lässt sich der Reduktionsgrad der Reduktase bei konstantem $E_{L/P}$ verändern durch Variation der NAD-Konzentration. Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung ist bei NAD-Konzentration unter 0.05 mM sehr langsam, erhöht sich jedoch mit jeder NAD-Zugabe.

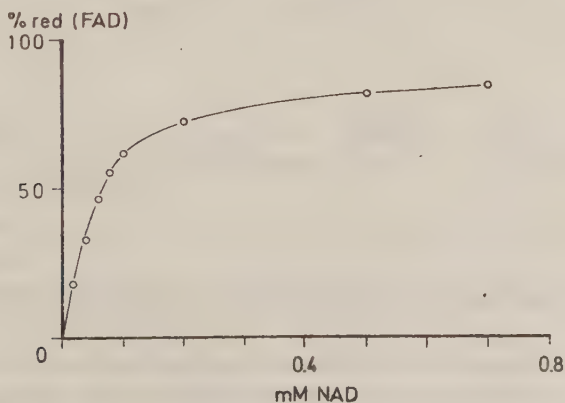


Abb. 46 $E_{L/P} = -159$ mV, $1 \mu\text{M}$ LDH, $0.4 \mu\text{M}$ FAD
 $1 \text{ ml TRAP } 0.1 \text{ M pH } 7.0$

3.5.3.3 pH-Abhängigkeit des scheinbaren Mittelpotentials
Die Redox titrationen bei verschiedenen pH-Werten ergaben unter Berücksichtigung der pH-Abhängigkeit des Lac/Pyr-Potentials selbst ($E_o = 239 - 59 \text{ pH [mV]}$) folgende Mittelpotentiale der Reduktase:

pH	$E_o \text{ L/P}$	E_a	$\text{mV}/\Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$
7.9	- 244 mV	- 191 mV	18 mV
7.4	- 203	- 172	15
7.0	- 180	- 158	15
6.4	- 159	- 135	13

(3 μM FAD, 0.7 mM NAD, 1 μM LDH b.s.)

Auffällig ist neben der pH-Abhängigkeit des E_a auch die des scheinbaren Elektronenübergangskoeffizienten n' .

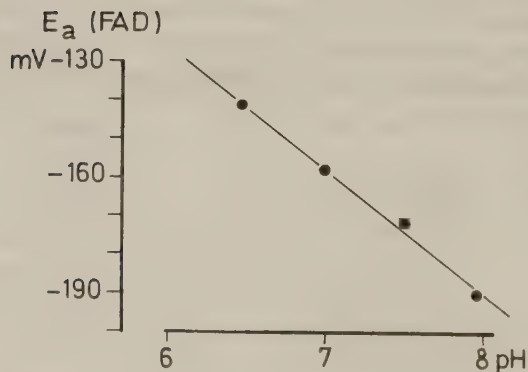


Abb. 47 pH-Abhängigkeit des 'scheinbaren Mittelpotentials' E_a der Reduktase

Durch die 4 Mittelpotentiale lässt sich in guter Näherung eine Gerade legen mit der Steigung - 33 mV/pH.

3.5.4 Das Redox-Verhalten des isolierten Cyt.b₅

3.5.4.1 Reduktion des Cyt.b₅ mit NADH/NAD

Um die Autoxidation zu vermindern, wurde der Sauerstoffpartialdruck in der Lösung verringert durch mehrfaches Evakuieren an der Wasserstrahlpumpe und Begasen mit O₂-gereinigtem N₂ (90% N₂, 10% CO₂). Wegen der noch vorhandenen geringen Mengen O₂ wird bei Reduktion des Cyt. b₅ kein Gleichgewicht erreicht, sondern der Reduktionsgrad nimmt nach NADH-Zugabe sofort wieder ab. Die Reduktion des Cyt.b₅ ist so schnell, dass sie nicht vom Rühr-Artefakt zu trennen ist.

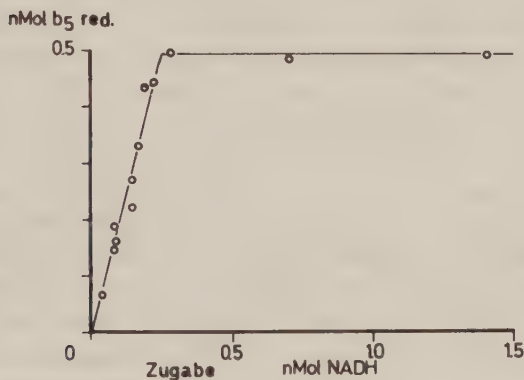
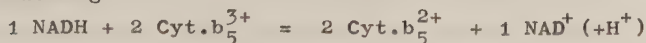


Abb. 48 0.5 ml 0.1 M TRIS/HCl pH 7.0, Reduktase 1 μ M, Cyt. b₅, 1 μ M, Messung der Cyt.b₅-Reduktion bei 424 nm.

Die stöchiometrische Zugabe von NADH bestätigt die Beziehung



Die Reduktion des Cyt.b₅ durch NADH ist noch vollständig bei einem NAD/NADH-Verhältnis von $1.5 \cdot 10^5$.

Dieses Verhältnis entspricht einem Redox-Potential von - 65 mV. Das Mittelpotential des Cyt.b₅ muss also noch positiver sein.

3.5.4.2 Das scheinbare Mittelpotential des Cyt.b₅

3.5.4.2.1 Titration der Kombination lys-Reduktase/try-Cyt.b₅

Im Gegensatz zu den Redox-titrations des Cyt.b₅-Systems in Anoxie lässt sich im aeroben System das Cyt.b₅ oxidieren und ein vom $E_{L/P}$ abhängiger stabiler Reduktionsgrad einstellen. Das scheinbare Mittelpotential E_a des Cyt.b₅ ist abhängig von der LDH-, NAD-, Reduktase- und Cyt.b₅-Konzentration. Unter konstanten Bedingungen sind die Titrations reproduzierbar, in den Abb. 50 - 52 ist von den mehrfach ausgeführten Titrations nur eine typische Kurve gezeigt. In der Auftragung $\log \frac{ox}{red}$ (Cyt.b₅) gegen $E_{L/P}$ ergibt sich in fast allen Fällen in guter Näherung eine Gerade, in einigen Fällen ist eine zum positiven Potential konkave Krümmung zu sehen. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt $10 - 12 \text{ mV}/\Delta \log \frac{ox}{red} = 1$, also $n' = 5 - 6$, ausser den Titrations mit FAD-Konzentrationen unter $0.02 \mu\text{M}$. Die Titrations sind weitgehend reversibel. Bei der Rücktitration liegen die Gleichgewichte oft aber bei $2 - 5 \text{ mV}$ negativerem Potential, wenn die Cyt. b₅-Konzentration grösser als $1.5 - 2 \mu\text{M}$ ist und die Substratkonzentrationen an Lactat und Pyruvat kleiner als $1 - 3 \text{ mM}$ sind. Dann nämlich hat der Verlust reduzierender Äquivalente einen Einfluss auf das L/P-Verhältnis: um den gleichen Reduktionsgrad des Cyt.b₅ zu erreichen, muss mehr Lactat zugesetzt werden. Da das angegebene Redox-Potential nur die eingesetzten Mengen an Lac/Pyr berücksichtigt, verschiebt sich also die Kurve zum negativeren Potential. Auch zeigt es sich häufig, dass bei Rücktitrationen mit Lactat

die Reduktionskinetik des Cyt.b₅ sehr langsam ist und die Gleichgewichtseinstellung mehr als 10 - 15 Minuten dauern kann. Wenn die langsame Kinetik für ein Gleichgewicht angesehen wird, erscheint der Titrationspunkt fälschlich negativer als bei der Hintitration.

Abhängigkeit des E_a von der Reduktase-Konzentration

(konstant: Cyt.b₅ 0.7 µM, NAD 0.2 mM, LDH 1 µM)

Reduktase	E _a	mV/Δlog $\frac{ox}{red}$ = 1
0.3 µM	- 130 mV	11 mV
0.1	- 138	11
0.07	- 142	12
0.02	- 151	12
0.007	- 158	15
0.001	- 173	17
0.001	- 180	18

Abhängigkeit des E_a von der Cyt.b₅-Konzentration

(konstant: Reduktase 0.07 µM, NAD 0.2 mM, LDH 1 µM)

Cyt.b ₅	E _a	mV/Δlog $\frac{ox}{red}$ = 1
0.05 µM	- 123 mV	10 mV
0.6	- 136	11
1.2	- 142	11
3.6	- 152	11
12	- 163	10

Abhängigkeit des E_a von der NAD-Konzentration

(konstant: Reduktase 0.07, b_5 0.7 μM , LDH 1 μM)

NAD	E_a	$\text{mV}/\Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$
1 mM	- 135 mV	11 mV
0.1	- 142	11
0.02	- 158	11

Abhängigkeit des E_a von der LDH-Konzentration

Bei einem mit Lac/Pyr eingestellten Redox-Potential lässt sich durch Zugabe von Dehydrogenase der Reduktionsgrad des Cyt. b_5 erhöhen.

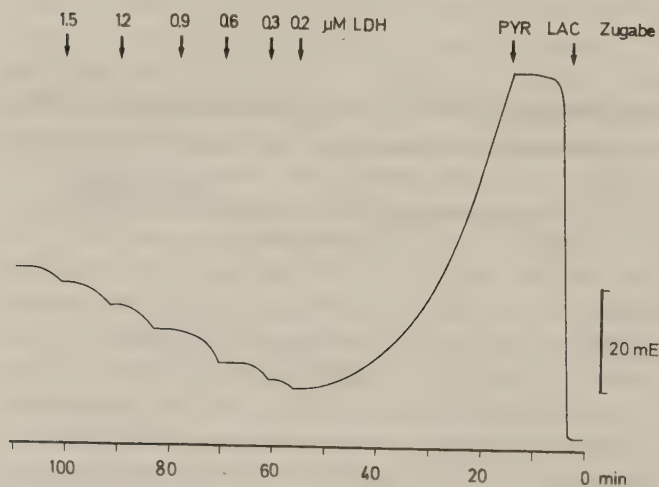


Abb. 53 Messung der Extinktionsdifferenz, $\Delta E(424 - 450\text{nm})$
0.07 μM Reduktase, 0.1 μM LDH, 0.7 μM Cyt. b_5

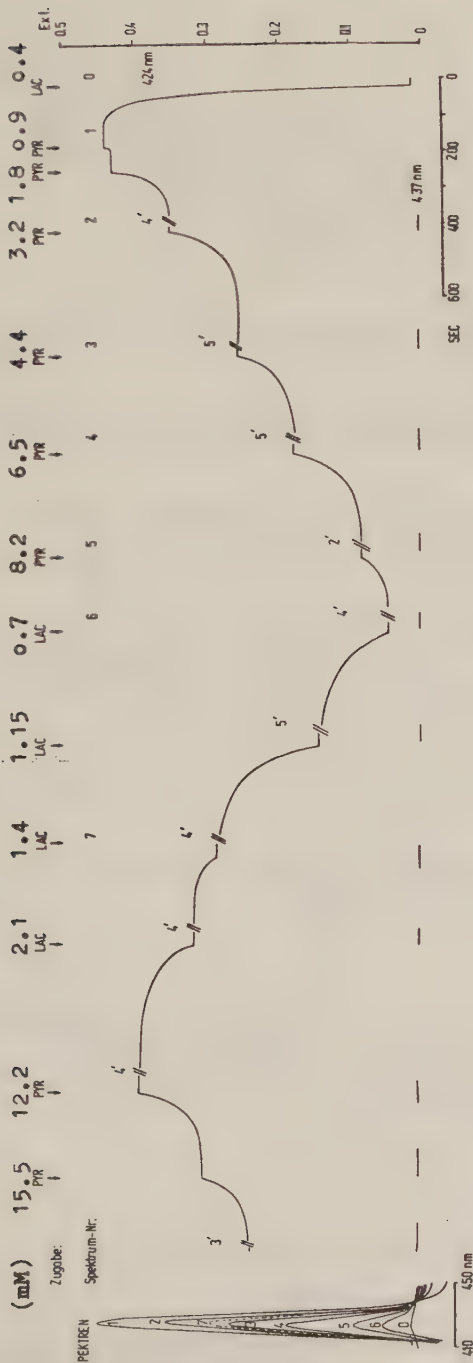


Abb. 49 Redox-Titration des isolierten try-Cyt. b_5 mit Lactat/Pyruvat am Cary-Spektrophotometer
Messung der Kinetik bei 424 nm (Unterbrechung angegeben in Minuten),
des isobestischen Punktes bei 437 nm, und des Spektrums.
 b_5 3.6 μ M, Reduktase 0.07 μ M, NAD 0.2 mM, LDH 1 μ M.

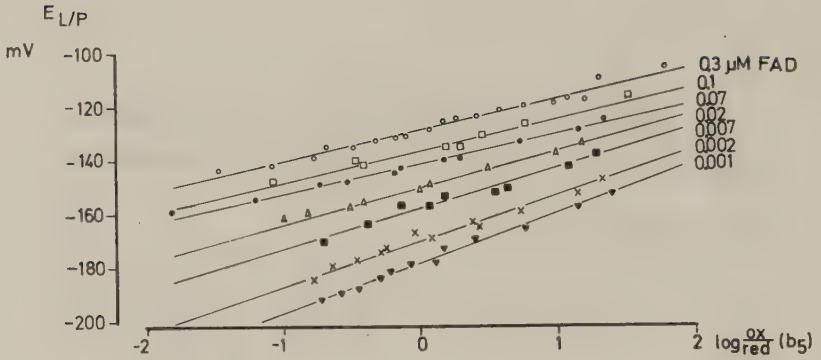


Abb. 50 Redox-Titration des try- b_5 mit Lac/Pyr in Abhängigkeit von der Reduktasekonzentration (FAD)

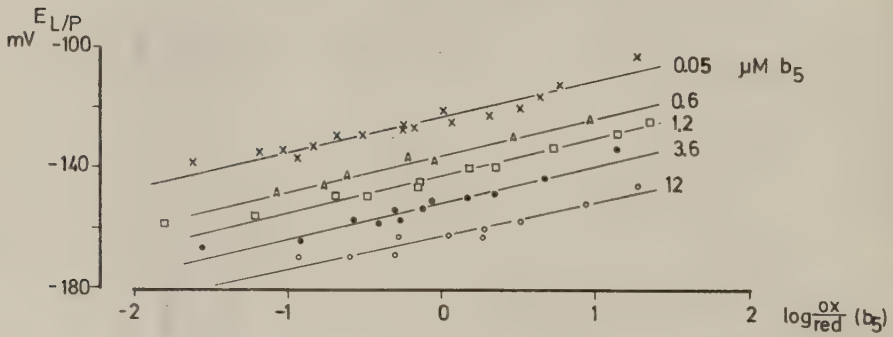


Abb. 51 Abhängigkeit der Redox-Titration von der Cyt. b_5 -Konzentration

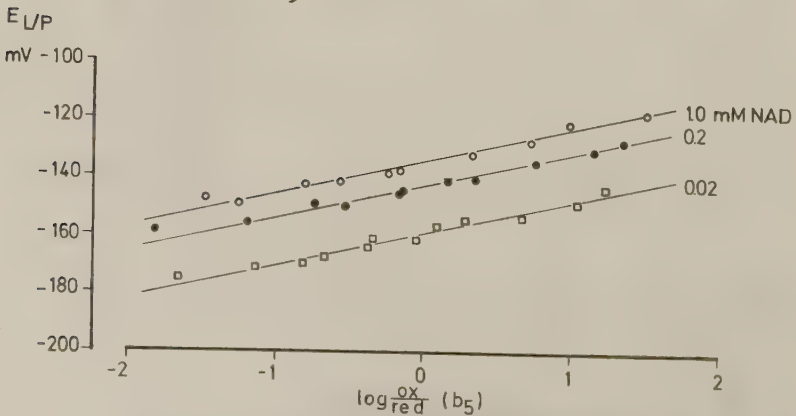


Abb. 52 Abhängigkeit der Redox-titration von der NAD-Konzentration

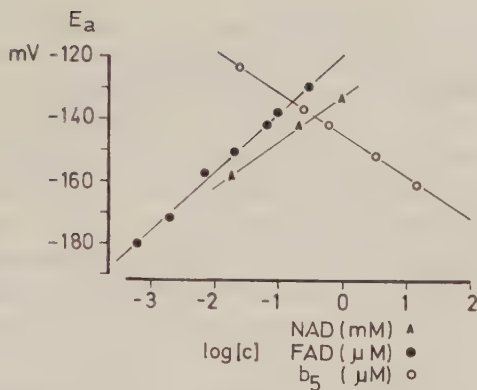


Abb. 54 Abhängigkeit des scheinbaren Mittelpotentials des Cyt.b₅ vom Logarithmus der Konzentrationen an NAD, Reduktase und Cyt.b₅

Abhängigkeit des E_a vom pH

(konstant: 0.7 μM Cyt. b₅, NAD 0.2 mM, Reduktase 0.07 μM, LDH 1 μM)

pH	E' _o L/P	E _a
6.7	- 162 mV	- 124 mV
7.0	- 180	- 143
7.5	- 210	- 162
8.7	- 262	- 213

Die Werte des scheinbaren Mittelpotentials liegen auf einer Geraden mit der Steigung - 46 mV/pH.

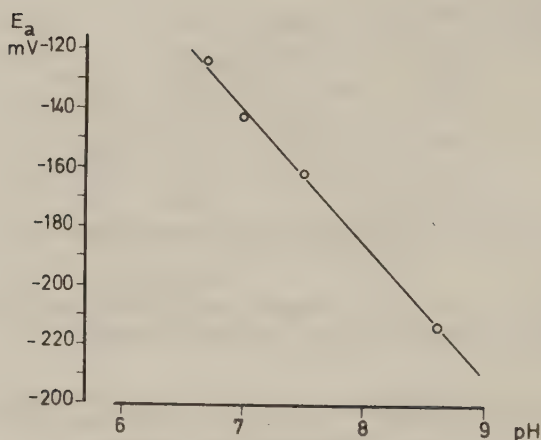


Abb. 55 pH-Abhängigkeit des scheinbaren Mittelpotentials von Cyt.b₅

Die Titrationsen der Kombination lys-Reduktase/try-Cyt.b₅ mit dem Redoxpaar Malat/Oxalacetat ergaben die gleichen Titrationskurven wie bei L/P-Titrationsen, sowie die gleichen Abhängigkeiten des E_a von der MDH-, NAD-, Reduktase- und Cyt.b₅-Konzentration. Allerdings waren die E_a -Werte 5 - 8 mV negativer, wie es sich auch schon bei den Redox-titrationsen der Reduktase (siehe 3.3.3.2 und 3.5.3.1) ergeben hat. Diese Differenz zeigt, dass sich die Mittelpotentiale des Lac/Pyr- und des Mal/Oxac-Paares nicht um 10 mV unterscheiden, wie bei den angenommenen Mittelpotentiale E'_0 L/P = - 180 mV, E'_0 M/O = - 170 mV, sondern um ca. 15 - 18 mV.

3.5.4.2.2 Redox-titration der Kombination det-Reduktase/det-Cyt.b₅
Die Titration des mit Detergens isolierten Systems Reduktase/Cyt.b₅ ergibt keinen wesentlichen Unter-

schied zu dem mit Proteasen isolierten System. Einzig die Abhängigkeit des 'scheinbaren Mittel-potentials' von der Cyt. b_5 -Konzentration ist stärker ausgeprägt.

Die Regressionsgerade durch die in Abb. 56 gegen E_a aufgetragenen Werte $\log [\text{Cyt. } b_5]$ hat eine Steigung von - 34 mV (1 μM Reduktase), bzw. - 29 mV (2 μM Reduktase) pro $\Delta \log [\text{Cyt. } b_5] = 1$, im Gegensatz zum System lys-Reduktase/try- b_5 , wo sie - 13 mV pro $\Delta \log [\text{Cyt. } b_5] = 1$ beträgt.

Abhängigkeit des E_a von der Cyt. b_5 -Konzentration

(konstant: LDH 2 μM , NAD 0.2 mM)

<u>0.5 μM Reduktase</u>			<u>2 μM Reduktase</u>		
[Cyt. b_5]	E_a	$\text{mV}/\Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$	[Cyt. b_5]	E_a	$\text{mV}/\Delta \log \frac{\text{ox}}{\text{red}} = 1$
0.4 μM	-110mV	10 mV	0.8 μM	- 112mV	12 mV
0.7	-121	10	1.3	- 114	10
2.0	-130	9	1.8	- 119	10
3.2	-136	10	2.8	- 127	11
6,6	-148	9	4.2	- 130	10
12	-158	10	9.0	- 136	8
			15.8	- 145	10

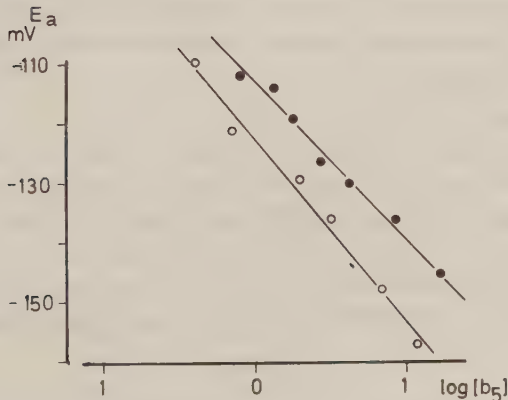


Abb. 56 Abhängigkeit des E_a vom Logarithmus der Cyt. b_5 -Konzentration

Die Form der einzelnen Titrationskurven unterscheidet sich nicht voneinander. Die durchschnittliche Steigung der Regressionsgeraden in der Auftragung $\log \frac{\text{ox}}{\text{red}}$ gegen das $E_{L/P}$ ist 10 mV, das entspricht $n' = 6$.

Zusatz von Detergens

Wird zum aeroben System det-Reduktase/det-Cyt. b_5 1% TRITON X-100 0.5% DOC zugegeben, so verschiebt sich die Lage der Titrationskurve bei gleicher Form um 5 - 10 mV zum negativen Potential. Die Verschiebung ist am deutlichsten bei hohem Verhältnis Cyt. b_5 /Reduktase. Die Kinetiken der Reduktion und Oxidation sind nicht verändert. Dieses Verhalten ist analog der bei Mikrosomen nach Detergenszusatz beobachteten Verschiebung, die dort - 9 mV betrug (siehe 3.5.2). Zugabe von Detergens zum aeroben System lys-Reduktase/try-Cyt. b_5 verursacht keine Verschiebung.

3.5.4.3 Lac/Pyr-Titration des mikrosomalen und isolierten Cyt. b_5 in Gegenwart von NADPH

Da es nicht möglich war, ein NADPH-regenerierendes System mit Redox-Puffer-Eigenschaften zu schaffen wie das NADH-System, das bei einem festen Redox-Grad eine konstante niedrige NADPH-Konzentration liefert, musste bei höheren NADPH-Konzentrationen gemessen werden.

Mikrosomen

Bei einem Ansatz mit dem $E_{L/P}$ von - 150 mV, 1 μM LDH, 0.8 mM NAD und 0.9 mg/ml Mikrosomen, ist das Cyt. b_5 völlig oxidiert. Bei Zugabe von NADPH zwischen 1 und 10 μM wird Cyt. b_5 sofort für die Dauer von 1 - 2 min zu 100% reduziert. Die Dauer der Reduktion ist proportional der NADPH-Konzentration und lässt sich

durch kein noch so positives $E_{L/P}$ verkürzen. Der Fluss reduzierender Äquivalente über die NADPH-Cyt.c-Reduktase zum Cyt.b₅ ist also viel grösser als der Abfluss zum Sauerstoff und zum Lac/Pyr-System. Die Grösse und Dauer der Cyt.b₅-Reduktion entspricht einer Zugabe der gleichen Menge NADH.

Isoliertes Cyt.b₅

Wegen der geringen NADPH-Cyt.b₅-Reduktase-Aktivität lässt sich der Reduktionsgrad des Cyt.b₅ bei konstantem $E_{L/P}$ durch NADPH-Zugabe erhöhen. Der maximale Reduktionsgrad geht dann wieder langsam zurück auf einen Wert, der über dem ursprünglichen, mit Lac/Pyr im Gleichgewicht befindlichen Reduktionsgrad liegt und etwa dem Potential des Verhältnisses (Lac + NADPH)/Pyr entspricht. Die NADH-Cyt.b₅-Reduktase wirkt also als Transhydrogenase. Während des Flusses reduzierender Äquivalente vom NADPH zum Pyruvat wird das im 'Nebenschluss' liegende Cyt.b₅ reduziert, aber nicht schneller als die maximale Autoxidationsgeschwindigkeit, so dass der Reduktionsgrad 100% nicht erreicht wird.

4 DIE SIMULATION DES CYT. B_5 -SYSTEMS AM KINETISCHEN MODELL

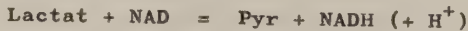
4.1 Die Aufstellung des kinetischen Modells

Das System der Redoxtitration von Cyt. b_5 mit Lac/Pyr bzw. Mal/Oxac lässt sich aufteilen in die Dehydrogenase-Reaktion und die Reduktase-Reaktion, die untereinander über das freie NADH in Verbindung stehen. Beide Reaktionen lassen sich getrennt betrachten.

4.1.1 Die Dehydrogenase-Reaktion

4.1.1.1 LDH-Reaktion

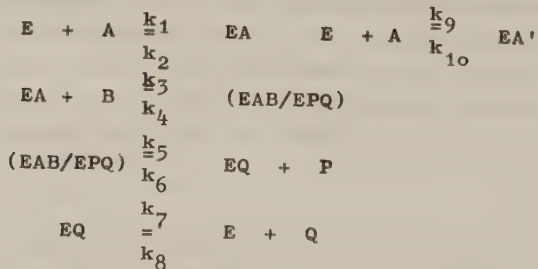
Die Gesamtreaktion



mit der Gleichgewichtskonstante

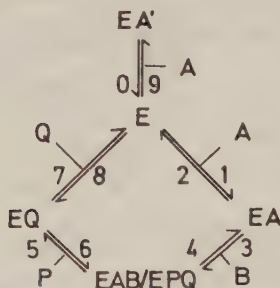
$$K_{\text{eq}} = \frac{\text{Pyr} \cdot \text{NADH}}{\text{Lac} \cdot \text{NAD}} \cdot \text{H}^+$$

wird als ein ordered bi bi Mechanismus aufgefasst (KING und ALTMAN 1956)



Hierbei bedeuten E Enzym
A Substrat NAD
B Substrat Lac
P Produkt Pyr
Q Produkt NADH

Die cyclische Enzymreaktion kann geschrieben werden:



Lactat und NAD treten also in definierter Reihenfolge an das Enzym, um es nach der Reaktion in ebenso definierter Reihenfolge zu verlassen. Die eigentliche Umsetzung am Ezym-Substrat-Komplex, der Übergang $EAB \rightarrow EPQ$ wird als vernachlässigbar schnell aufgefasst.

Die Reaktionsgeschwindigkeit im ordered bi bi Mechanismus ohne EA' ist nach H.J. FROMM 1975

$$v = \frac{(k_1 k_3 k_5 k_7 AB - k_2 k_4 k_6 k_8 PQ) E_0}{[E] + [EA] + [EAB/EPQ] + [EQ]}$$

Die Konzentration der einzelnen Enzymformen errechnet sich nach KING und ALTMAN (1956) und WOLKENSTEIN und GOLDSTEIN (1966)

$$\begin{aligned} [E] &= k_3 k_5 k_7 B + k_2 k_5 k_7 + k_2 k_4 k_7 + k_2 k_4 k_6 P \\ [EA] &= k_1 k_4 k_6 AP + k_1 k_4 k_7 A + k_1 k_5 k_7 A + k_4 k_6 k_8 PQ \\ [EAB/EPQ] &= k_2 k_3 k_7 AB + k_3 k_6 k_8 QP + k_1 k_3 k_6 ABP + k_3 k_6 k_8 BPQ \\ [EQ] &= k_2 k_4 k_8 Q + k_2 k_5 k_8 Q + k_1 k_3 k_5 AB + k_3 k_5 k_8 BQ \end{aligned}$$

Die Anfangsgeschwindigkeit bei $P, Q = 0$ ist

$$v = \frac{k_1 k_3 k_5 k_7 AB \cdot E_0}{k_1 k_3 (k_5 + k_7) AB + k_1 k_7 (k_4 + k_5) A + k_3 k_5 k_7 B + k_2 k_5 (k_4 + k_5)}$$

und es ergibt sich nach Kürzen durch $k_1 k_3 (k_5 + k_7) AB$

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{k_7(k_4 + k_5)}{k_3(k_5 + k_7)B} + \frac{k_5 k_7}{k_1(k_5 + k_7)A} + \frac{k_2 k_7(k_4 + k_5)}{k_1 k_3(k_5 + k_7)AB}}$$

hierbei ist $v_{\max} = V_1 = \frac{k_5 k_5 E_0}{k_5 + k_7}$

$$K_M(A) = \frac{k_5 k_7}{k_1(k_5 + k_7)}$$

$$K_M(B) = \frac{k_7(k_4 + k_5)}{k_3(k_5 + k_7)}$$

$$K_{AB} = K_{\text{Diss.}(A)} \cdot K_{M(B)} = \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{k_7(k_4 + k_5)}{k_3(k_5 + k_7)}$$

Die Gleichung lässt sich in einfacher Form schreiben

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_A}{A} + \frac{K_B}{B} + \frac{K_{AB}}{AB}}$$

Um Experiment und Modellrechnung zur Übereinstimmung zu bringen, wurde von ZEWÉ und Fromm (1965) in das einfache ordered bi bi Modell ein zusätzlicher Komplex AE' eingeführt. Das Kriterium zur Einführung ist das DALZIEL-Kriterium, modifiziert nach SCHWAB

$$(V_1 + V_2 - V_2 \cdot K_A/K_{iA} - V_1 K_q/K_{iq}) > 0.$$

Auf diese Weise werden für K_{ip} und K_{iB} negative Werte vermieden, was sonst zu negativen Geschwindigkeitskonstanten führen würde.

Die Geschwindigkeitskonstanten müssen aus den gemessenen kinetischen Parametern errechnet werden. Die kinetischen Parameter lauten nach der Nomenklatur von CLELAND 1963

$$V_1 = V_{\max.v.} \text{ (max. Vorwärtsgeschwindigkeit)}$$

$$K_A = K_M \text{ LDH/NAD (Michaeliskonstante)}$$

$$K_{iA} = K_D \text{ LDH/NAD} = \frac{K_{AB}}{K_B} \text{ (Dissoziationskonstante)}$$

$$K_B = K_M \text{ LDH/Lac (Michaeliskonstante)}$$

$$K_{AB} = K_D \text{ NAD} \cdot K_M \text{ Lac}$$

$$V_2 = V_{\max.r.} \text{ (Max. Rückwärtsgeschwindigkeit)}$$

$$K_P = K_M \text{ LDH/Pyr (Michaeliskonstante)}$$

$$K_q = K_M \text{ LDH/NADH (Michaeliskonstante)}$$

$$K_{iq} = K_D \text{ LDH/NADH (Dissoziationskonstante)}$$

Nach ZEWE und FROMM (1965) sind die Werte für die kinetischen Konstanten der Kaninchenmuskel-LDH

$$\begin{array}{ll} V_1 = 3.58 \cdot 10^{-6} & \text{(M/80 sec.) in 0.1 M TRIS, pH7.15} \\ K_A = 1.69 \cdot 10^{-4} & \text{(M)} \\ K_B = 1.09 \cdot 10^{-2} & \text{(M)} \\ K_{AB} = 5.1 \cdot 10^{-6} & \text{(M}^2\text{)} \\ V_2 = 16.7 \cdot 10^{-6} & \text{(M/80 sec.)} \\ K_q = 7.43 \cdot 10^{-6} & \text{(M)} \\ K_P = 2.09 \cdot 10^{-4} & \text{(M)} \\ K_{pq} = 1.14 \cdot 10^{-9} & \text{(M}^2\text{)} \end{array}$$

Nach MAHLER (1961) ist es allerdings bedenklich, die kinetischen Konstanten der LDH-Reaktionen in TRIS-Puffer zu messen, wie in der Untersuchung von ZEWE und FROMM, wegen der Komplexbildung von Keto-Säuren. Die Werte müssen korrigiert werden hinsichtlich der unterschiedlichen $V_{\max}$ der Rattenleber-LDH (siehe 3.1.2).

$$V_{\max} = V_2 = 610 \text{ U/mg} = 355.8 \text{ [Mol Substrat/sec/Mol Enzym Subunit]}$$

Daraus mit $V_1/V_2 = 0.2144$

$$V_1 = 76.770 \text{ [Mol Substrat/sec/mol Enzym Subunit]}$$

Trotz der gemessenen NADH-LDH-Dissoziationskonstanten von $0.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ wird der Wert

$$K_{iq} = \frac{K_{pq}}{K_p} = 5.45 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

für die Berechnungen zugezogen. Nach JAENICKE (1972) ist die mit kinetischen Methoden ermittelte Dissoziationskonstante um den Faktor 10 grösser als die mit thermodynamischen Methoden. Dies entspricht hier $5 \mu\text{M}$ statt $0.5 \mu\text{M}$. Tatsächlich ergibt der Wert $0.5 \mu\text{M}$ für k_5 eine negative Zahl, da k_7 eine Zehnerpotenz kleiner ist. Die Geschwindigkeitskonstanten aus den kinetischen Parametern abgeleitet und auf Sekunden und auf Enzym-Bindungsstellen bezogen, sind damit:

$$\begin{aligned} k_1 &= \frac{V_1}{K_A} & k_1 &= 4.513 \cdot 10^5 \text{ (sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}) \\ k_2 &= \frac{V_1 \cdot K_{AB}}{K_A \cdot K_{B'}} & k_2 &= 3.969 \cdot 10^2 \text{ (sec}^{-1}) \\ k_3 &= \frac{V_1}{K_{B'}} \left(1 + \frac{k_4}{k_5}\right) & k_3 &= 3.329 \cdot 10^5 \text{ (sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}) \\ \frac{1}{k_4} &= \frac{1}{V_2} - \frac{1}{k_2} & k_4 &= 3.435 \cdot 10^3 \text{ (sec}^{-1}) \\ \frac{1}{k_5} &= \frac{1}{V_1} \left(-\frac{k_9}{k_0} K_A\right) - \frac{1}{k_7} & k_5 &= 1.52 \cdot 10^2 \text{ (sec}^{-1}) \\ k_6 &= \frac{V_2}{K_p} \left(1 + \frac{k_5}{k_4}\right) & k_6 &= 1.773 \cdot 10^6 \text{ (sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}) \\ k_7 &= \frac{V_2 \cdot K_{pq}}{K_p \cdot K_q} & k_7 &= 2.612 \cdot 10^2 \text{ (sec}^{-1}) \\ k_8 &= \frac{V_2}{K_q} & k_8 &= 4.75 \cdot 10^7 \text{ (sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}) \end{aligned}$$

$$K_{B'} = K_B \left(1 - \frac{k_9 \cdot K_{AB}}{k_o \cdot K_B} \right) = K_B - \frac{k_9}{k_o} \cdot K_{AB} = 5.80 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{Annahme: } \frac{k_9}{k_o} = 1000$$

$$k_9 = 10^9 (\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1})$$

$$k_o = 10^6 (\text{sec}^{-1})$$

Mit diesen Geschwindigkeitskonstanten ist die Gleichgewichtskonstante

$$K_{eq} = \frac{k_1 k_3 k_5 k_7}{k_2 k_4 k_6 k_8} \cdot [H]$$

$$\text{Bei pH 7: } K'_{eq} = 5.19 \cdot 10^{-12}.$$

4.1.1.2 MDH-Reaktion

Für die MDH gilt das gleiche ordered bi bi Modell wie für die LDH, ausser dem Fehlen des Komplexes EA', k_9 und k_o entfallen also. Die Schweineherz-MDH (Boehringer) hat eine spezifische Aktivität von 1.100 Units/mg.

$$V_2 = 641.6 \quad [\text{Mol Substrat/sec/Mol Enzym Subunit}]$$

$$V_1 = \frac{V_2}{3.3} = 134.4$$

Mit den kinetischen Daten von RAVAL und WOLFE (1962) ergibt sich

$$k_1 = 6.480 \cdot 10^5 (\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1})$$

$$k_2 = 6.804 \cdot 10^2 (\text{sec}^{-1})$$

$$k_3 = 1.083 \cdot 10^6 (\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1})$$

$$k_4 = 1.125 \cdot 10^4 (\text{sec}^{-1})$$

$$\begin{aligned}k_5 &= 4.803 \cdot 10^3 \quad (\text{sec}^{-1}) \\k_6 &= 1.928 \cdot 10^7 \quad (\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}) \\k_7 &= 2.026 \cdot 10^2 \quad (\text{sec}^{-1}) \\k_8 &= 4.01 \cdot 10^7 \quad (\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1})\end{aligned}$$

$$K_{eq} = \frac{k_1 k_3 k_5 k_7}{k_2 k_4 k_6 k_8} \cdot [\text{H}^+]$$

$$\text{bei pH 7: } K'_{eq} = 1.16 \cdot 10^{-12}$$

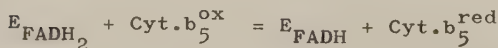
4.1.2

Die Cytochrom b_5 -Reduktase-Reaktion

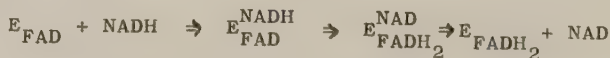
Die Nettoreaktion von NADH und Cyt. b_5 mit der Reduktase



verläuft in 3 Teilschritten.

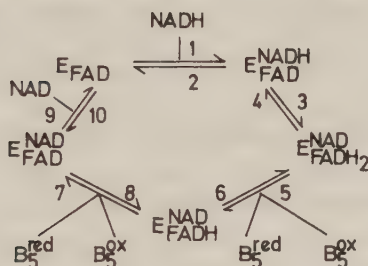


Nach ROGERS und STRITTMATTER (1974) und STRITTMATTER (1966) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion die Reduktion des Flavins nach NADH-Anlagerung.



Die Gesamtreaktion lässt sich in verschiedenen Mechanismen formulieren:

4.1.2.1 'ordered bi uni uni bi doppelter Theorell-Chance'



Die Zahlen stellen die Indices der Geschwindigkeitskonstanten dar.

NADH	A
b_5^{ox}	B
b_5^{red}	P
NAD	Q

Die Reaktion mit Cyt.b_5 ist als doppelter Theorell-Chance-Mechanismus formuliert. Durch den Verzicht auf den ES-Komplex werden Geschwindigkeitskonstanten gespart und die Reaktion vereinfacht. Dies ist möglich unter der Voraussetzung eines grossen Verhältnisses Zerfallskonstanten/Bildungskonstanten des ES-Komplexes, also kleiner Konzentrationen an ES.

Die Geschwindigkeit der Reaktion, genauer die 'steady state reaction rate', ist

$$v' = \frac{E_t (k_1 k_3 k_5 k_7 k_9 A B^2 - k_2 k_4 k_6 k_8 k_{10} P Q^2)}{E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5} = \frac{(k_3 \cdot E_2 - k_4 \cdot E_1) E_t}{\sum E_i}$$

$$\begin{aligned}
 E_1 = [E_{FAD}] &= 2468P^2 + 2469P + 2479B + 2579B_2 + 3579B^2 \\
 E_2 = [E_{FAD}^{NADH}] &= 4680P^2Q + 1468P^2A + 1469AP + 1479AB + 1579AB^2 \\
 E_3 = [E_{FADH_2}^{NAD}] &= 0268QP^2 + 0368P^2Q + 1368P^2A + 1369AP + 1579AB \\
 E_4 = [E_{FADH}^{NAD}] &= 0248QP + 0258QPB + 0358QBP + 1358ABP + 1359AB \\
 E_5 = [E_{FAD}^{NAD}] &= 0246QP + 0247QB + 0257QB^2 + 0357QB^2 + 1357AB^2
 \end{aligned}$$

Die Zahlen sind die Indices der Geschwindigkeitskonstanten ($k_{10} = 0$)

Zu Beginn der Reaktion sind

$$P, Q = 0$$

Die 'initial reaction rate' ist

$$v = \frac{13579 AB^2 \cdot E_t}{579(2 + 3)B^2 + 2479B + 19(47 + 37 + 35)AB + 157(3+9)AB^2}$$

Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird k_3 angesehen. Mit

$$k_3 \cdot E_t = v_{\max}$$

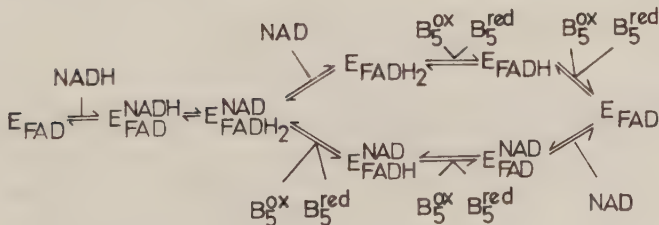
ist die Geschwindigkeit

$$v = \frac{k_3 \cdot E_t}{\frac{k_2 + k_3}{k_1 [NADH]} + \frac{k_2 k_4}{k_1 k_5 [NADH] [b_5^{ox}]} + \frac{k_4 k_7 + k_3 (k_5 + k_7)}{k_5 k_7 [b_5^{ox}]} + \frac{k_3}{k_9} + 1}$$

In diesem Modell muss angenommen werden, dass NAD im Komplex $E_{FADH_2}^{NAD}$ nicht abdissoziiert, wohl aber im Komplex E_{FAD}^{NAD} , und zwar hier schneller als die übrigen Reaktionen. Dann sollten im Experiment hohe NAD-Konzentrationen die Reduktase-Reaktion kompe-

titiv hemmen, was aber nicht gemessen wird. Ausserdem spricht das Ergebnis der L/P-Titrations der Reduktase, die die Gültigkeit der Nernst-Gleichung für das Redox-Verhalten der Reduktase zeigen (siehe 3.3.3), gegen dieses Modell. Wäre die Bindung von NAD nicht vernachlässigbar klein, sollte bei dem Verhältnis NAD/NADH von 10^7 nur der Komplex $\text{E}_{\text{FADH}_2}^{\text{NAD}}$ beobachtet werden ohne Abdissoziation von NAD . Dieser Komplex würde nicht mehr im Gleichgewicht mit dem freien NADH/NAD -Potential stehen, so dass die Nernst-Gleichung nicht gültig sein könnte. Ausserdem zeigt sich, dass das Mittelpotential der Reduktase bei den anaeroben Titrations durch Veränderung der NAD -Konzentrationen um den Faktor 50 nicht verändert wird.

4.1.2.2 Random-Mechanismus

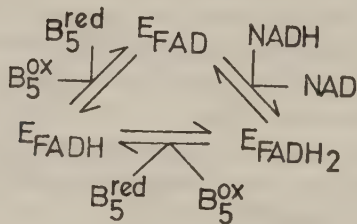


Das Prinzip des Random-Mechanismus ist die etwa gleich wahrscheinliche Reaktion des Cyt. b_5 mit $\text{E}_{\text{FADH}_2}^{\text{NAD}}$

und E_{FADH_2} . Der Nachteil des Modells ist die wegen der Verzweigung zu grosse Zahl von Geschwindigkeitskonstanten im Verhältniss zu den messbaren kinetischen Konstanten.

4.1.2.3 Hexa uni ping pong-Mechanismus

1. als dreifacher 'Theorell-Chance'-Mechanismus



$$E_{FAD} = 24 QP + 35 B^2 + 25 PB$$

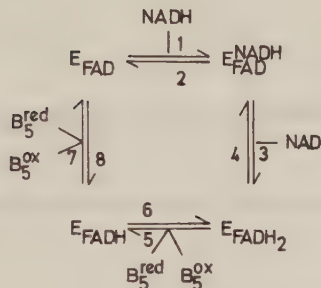
$$E_{FADH_2} = 15 AB + 14 QA + 46 Q^2$$

$$E_{FADH} = 13 AB + 36 BQ + 26 PQ$$

$$v = \frac{k_1 \cdot E_t}{\frac{1}{[NADH]} + \frac{k_1(k_3 + k_5)}{k_3 k_5 [b_5^{ox}]}}$$

Ein solcher dreifacher Theorell-Chance-Mechanismus ist also nicht möglich, da V_{max} bei NADH, $b_5^{ox} \rightarrow \infty$ und K_M von NADH bei $b_5^{ox} \rightarrow \infty$ nicht definiert sind.

2. als doppelter Theorell-Chance-Mechanismus



$$\begin{aligned}
 [\text{E}_{\text{FAD}}] &= 245\text{QP} + 247\text{PB} + 257\text{B}^2 + 357\text{B}^2 \\
 [\text{E}_{\text{FAD}}^{\text{NADH}}] &= 468\text{Q}^2\text{P} + 146\text{QPA} + 147\text{ABP} + 157\text{AB}^2 \\
 [\text{E}_{\text{FADH}_2}] &= 268\text{Q}^2 + 368\text{Q}^2 + 136\text{AQ} + 137\text{AB} \\
 [\text{E}_{\text{FADH}}] &= 248\text{QP} + 258\text{BQ} + 358\text{QB} + 135\text{AB}
 \end{aligned}$$

bei P, Q = 0

$$v = \frac{E_t \cdot k_1 k_3 k_5 k_7 \text{AB}^2}{k_5 k_7 \text{B}^2 (k_2 + k_3) + \text{AB} k_1 k_3 (k_5 + k_7) + k_1 k_5 k_7 \text{AB}^2}$$

$$v = \frac{k_3 \cdot E_t}{\frac{k_2 + k_3}{k_1 [\text{NADH}]} + \frac{k_3 (k_5 + k_7)}{k_5 k_7 \cdot [\text{B}_5^{\text{ox}}]} + 1}$$

Diese Formel geht auch aus dem bi uni uni bi-Mechanismus hervor, wenn dort $k_4 \ll k_3$ und $k_9 \gg k_3$ gesetzt wird.

Es sind

$$K_M \text{ für NADH: } K_A = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$K_M \text{ für } b_5: K_B = \frac{k_3(k_5 + k_7)}{k_5 k_7}$$

$$V_{\max} = E_t \cdot k_3$$

k_3 ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Gleichgewichtskonstante zwischen NAD/NADH und FAD/FADH₂:

$$K_{eq \ 1} = \frac{k_1 k_3}{k_2 k_4}$$

Gleichgewichtskonstante zwischen FAD/FADH₂ und b_5^{ox}/b_5^{red} :

$$K_{eq \ 2} = \frac{k_5 k_7}{k_6 k_8}$$

Die Michaeliskonstante der lys-Reduktase für NADH ist nach SPATZ und STRITTMATTER (1973)

$$K_A = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M.}$$

Nach eigenen Messungen sind

$$K_3 = 540 \text{ sec}^{-1}$$

$$K_B = 20 \cdot 10^{-6} (15 - 30 \cdot 10^{-6}) \text{ M}$$

$$K'_{eq \text{ NAD/FAD}} = 10^{205/29} = 1.172 \cdot 10^7$$

$$K'_{eq \text{ FAD/b}_5} = 9.236 \cdot 10^3$$

Es ergeben sich folgende Geschwindigkeitskonstanten

$$k_1 > 5.4 \cdot 10^8 \text{ (sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}\text{)}, \text{ angenommener Wert } 1 \cdot 10^9$$

$$k_2 = 1.46 \cdot 10^3 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$$

$$k_3 = 5.4 \cdot 10^3 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$$

$$k_4 = 5.43 \cdot 10^1 \text{ (sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Bei Annahme: } k_7 = 5 k_5$$

$$k_6 = k_8$$

$$k_5 = 1.62 \cdot 10^8 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$$

$$k_6 = 5.3 \cdot 10^6 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$$

$$k_7 = 8.1 \cdot 10^8 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$$

$$k_8 = 5.3 \cdot 10^6 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$$

Die Annahme, dass FADH etwas schneller mit b_5 reagiert als FADH_2 , kann begründet werden durch die Beobachtung, dass bei der Reduktase-Reaktion ein Semichinon-Spektrum nicht zu sehen ist.

4.1.3 Die Autoxidation

Bei Betrachtung der Autoxidation von NADH , FADH_2 und $\text{Cyt. } b_5$ wird von der Annahme ausgegangen, dass die Reaktion mit Sauerstoff in unabhängigen 1-Elektronen-Schritten beim $\text{Cyt. } b_5$ und in 2-Elektronen-Schritten beim FADH_2 und NADH vorgehen soll, so dass keine stöchiometrischen Koeffizienten auftreten.

4.1.3.1 NADH



Ox und Ored sind die oxidierten bzw. reduzierten

Sauerstoffspezies (O_2 , $O_2^{\cdot -}$, O_2^{2-} , O^{2-})

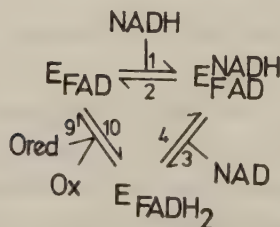
Die Geschwindigkeitskonstante ist nach Messungen des Sauerstoffverbrauchs einer NADH-Lösung

$$k = 2.6 \cdot 10^{-5} \text{ [sec}^{-1}\text{]}$$

4.1.3.2 Cyt.b₅-Reduktase

Soll die gemessene K_M der Reduktase zu Sauerstoff als Kennzeichen einer enzymatischen Reaktion angeführt werden, so muss die Autoxidation auch als enzymatischer Prozess geschrieben werden. Hierbei wird die mögliche Autoxidation von FADH ausser Acht gelassen.

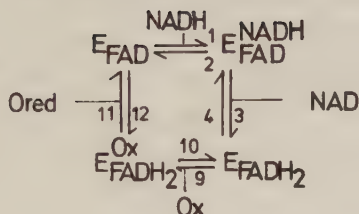
a)



$$v = \frac{k_9 \cdot E_t}{\frac{k_9(k_2 + k_3)}{k_1 k_3 [\text{NADH}]} + 1 + \frac{1}{[\text{Ox}]}}$$

In diesem Modell ist die K_M für O_2 nicht definiert.

b)



$$v = \frac{k_{11} \cdot E_t}{\frac{k_{11}(k_2 + k_3)}{k_1 k_3 [NADH]} + \frac{k_{10} + k_{11}}{k_9 [Ox]} + \frac{k_{11}}{k_3} + 1}$$

$$\begin{aligned} k_3 &= 540 \text{ (sec}^{-1}\text{)} \\ k_1 &= 1 \cdot 10^9 \text{ (sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}\text{)} \\ k_2 &= 1.4 \cdot 10^3 \text{ (sec}^{-1}\text{)} \end{aligned}$$

Die gemessenen Werte der Autoxidation (siehe 3.2.2.1) sind:

$$\begin{aligned} K_{M(Ox)} &= 11 \cdot 10^{-6} \text{ (M)} \\ k_{11} &= 0.1 \text{ (sec}^{-1}\text{)} \end{aligned}$$

$$\text{Daraus } K_{M(NADH)} = \frac{k_{11}(k_2 + k_3)}{k_1 k_3 (k_1 - \frac{k_{11}}{k_3})} = 0.9 \cdot 10^{-9} \text{ (M)}$$

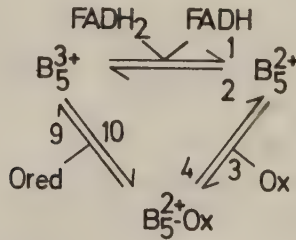
Die Michaeliskonstante zu NADH ist also 3 Zehnerpotenzen kleiner als bei der Reaktion von FADH mit b_5 wegen der kleinen Geschwindigkeitskonstante k_{11} , die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Mit $k_{11} = 0.1$ wird davon ausgegangen, dass stöchiometrisch durch einen Zwei-Elektronen-Übergang von einem FADH_2 -Molekül ein Atom O reduziert wird.

$$\begin{aligned} \text{Es ergibt sich} \quad k_9 &= 1.1 \cdot 10^5 \quad (\text{sec}^{-1}) \\ k_{10} &= 1.2 \\ k_{11} &= 0.1 \\ k_{12} &= 0 \end{aligned}$$

4.1.3.3 Cyt.b₅

Die Autoxidation des Cyt.b₅ wird ebenfalls als enzymatischer Vorgang aufgefasst:



$$\begin{aligned} v &= \frac{E_t \cdot k_{15}}{\frac{1}{[\text{FADH}_2]} + \frac{k_{15} + k_{14}}{k_{13}}} \\ K_M(\text{Ox}) &= \frac{k_{15} + k_{14}}{k_{13}} \end{aligned}$$

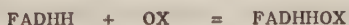
Hier ist die K_M zu FADH_2 nicht definiert, was aber die Berechnung der Autoxidationskonstanten nicht beeinträchtigt. ORED ist das Symbol für eine durch 1-Elektronen-Übergang reduzierte Sauerstoffspezies.

Gemessen wurde	$K_{M(ox)}$	$= 6.7 \cdot 10^{-6}$	(M)
	k_{15}	$= 0.02$	(sec^{-1})
Angenommen wird	k_{16}	$= 0$	(irreversible Reaktion)
	k_{14}	$= 10$	
Damit ist	k_{13}	$= 6.7 \cdot 10^7$	

4.2

Computer-Simulation der Redox Titration

Mit den in 4.1 erstellen Reaktionsmodellen und Geschwindigkeitskonstanten ist das simulierte Reaktionssystem gegeben. Es zeigt sich allerdings, dass die Autoxidationsgleichungen abzuändern sind. Besteht nämlich die Konkurrenz



(Bezeichnung der Chemikalie siehe unten)

so liegt wegen der hohen Konzentration an O_2 (angenommen mit 0.3 mM) und wegen der kleineren Michaeliskonstante zu O_2 als zu Cyt.b₅ das gesamte FADHH als Sauerstoff-Komplex vor, der für die Cyt.b₅-Reduktion im Gleichungssystem einen inaktiven Komplex darstellt.

Da die Michaeliskonstanten der Reduktase und des Cyt.b₅ zu Sauerstoff mit etwa 10 μM klein gegenüber der O_2 -Konzentration sind, die im aeroben Experiment mit offener Küvette durch die schnellere Nachdiffusion im Verhältnis zur Autoxidationsgeschwindigkeit nahezu konstant ist, werden alle Autoxidationsreaktionen

ohne ES-Komplex mit O_2 als monomolekularer Zerfall aufgefasst.

Das Gleichungssystem für die Simulation lautet also:

Nr.	Gleichung	Geschwindigkeitskonstanten	
LDHG=LDH+LNH+LNHPYR+LN+LN1			
1	LDH+NAD=LN	$k_1 = 4.069E5$	$k_2 = 3.58E2$
2	LN+LAC=LNHPYR	$k_3 = 3.00E5$	$k_4 = 3.10E3$
3	LNHPYR=LNH+PYR	$k_5 = 1.28E2$	$k_6 = 1.60E6$
4	LNH=LDH+NH	$k_7 = 2.36E2$	$k_8 = 4.3E7$
5	LDH+NAD=LN1	$k_9 = 1.E9$	$k_{10} = 1.E6$
6	NH+FAD=FADNH	$k_{11} = 1.9$	$k_{12} = 1.46E3$
7	FADNH=FADHH+NAD	$k_{13} = 5.4E2$	$k_{14} = 5.43E1$
8	FADHH+BOX=FADH+BRED	$k_{15} = 1.62E8$	$k_{16} = 5.3E6$
9	FADH+BOX=FAD+BRED	$k_{17} = 8.1E8$	$k_{18} = 5.3E6$
10	NH=NAD+ORED	$k_{19} = 2.6E5$	
11	FADHH=FAD+ORED	$k_{20} = 0.1$	
12	BRED=BOX+URED	$k_{21} = 0.02$	

(12 Gleichungen mit 21 Reaktionen und 18 Chemikalien)
 Zehnerpotenzen sind geschrieben: E vor Exponent.
 Die Geschwindigkeitskonstanten wurden während den Simulationen zum Teil verändert und sind dort angegeben.

Chemikalien-Name:

LAC	Lactat
PYR	Pyruvat
LDHG	Gesamt-LDH
LDH	LDH frei
NAD	NAD frei
LNH	LDH-NADH-Komplex
LNHPYR	LDH-NADH-Pyruvat-Komplex (LDH-NAD-Lactat-Komplex)
LN	LDH-NAD-Komplex

LN1	inaktiver LDH-NAD-Komplex
NH	NADH
FAD	FAD
FADHH	FADH ₂
FADNH	FAD-NADH-Komplex
BOX	Cyt.b ₅ ^{ox}
BRED	Cyt.b ₅ ^{red}
FADH	FADH• -Semichinon
ORED	Sauerstoff durch 2-Elektronenübergang reduziert
URED	Sauerstoff durch 1-Elektronenübergang reduziert

Die Simulation errechnet die Konzentrationen an 100 Zeitpunkten innerhalb der vorgegebenen Simulationszeit (6000 sec bzw. 300 sec). Die Zugabe von Substrat während der Titration wird simuliert durch eine neue Gesamtkonzentration an diesem Substrat, nicht durch eine Addition von vorhandenem plus zugegebenem Substrat. Dies bewirkt einen wichtigen Unterschied zum Experiment, bei dem ein kontinuierlicher Verlust reduzierender Äquivalente eine gleichmässige E_{L/P}-Verschiebung während der gesamten Titration bewirken kann, während diese Verschiebung in der Simulation nur zwischen zwei Zugaben wirksam ist.

4.2.1 Simulation der Reduktase-Titrationsen

4.2.1.1 Abhängigkeit der aeroben und anaeroben Titration von der Reduktase-Konzentration

Zu Abb. 57 (siehe nächste Seite)

1 μ M LDHG, 1 mM NAD, 2 μ M Reduktase

Abzisse: 0 - 100 Minuten, alle 10 Minuten Änderung des E_{L/P}

Ordinate: Skalenbreite 0 - 100 entspricht FADHH 2 μ M,
ORED 0.5 mM.

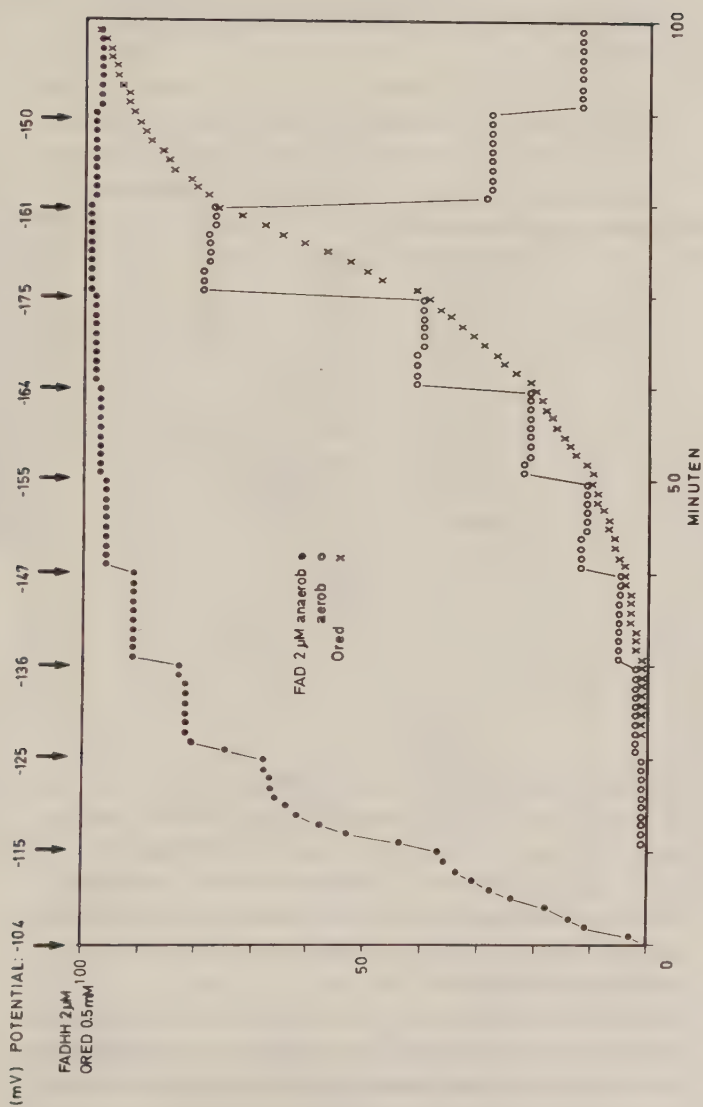


Abb. 57 Anaerobe und aerobe Reduktase-Titration

1. Anaerobe Titration

Am Endpunkt der Titration der Abb.57 liegen folgende Werte vor:

Name	Konzentration (C)	d(C)/dt	Reakt.-Nr.	Fluss
LDHG	1.000E-06	0.0	1	1.041E-C4
LOH	2.559E-07	0.0	2	1.041E-C4
LNH	2.248E-10	0.0	3	6.113E-C4
LNHPYR	1.971E-07	0.0	4	6.113E-C4
LN	2.910E-07	0.0	5	2.514E-C5
LN1	2.559E-07	0.0	6	2.514E-C5
NAD	1.000E-03	-3.638E-12	7	5.294E-C8
LAC	7.000E-03	2.861E-14	8	5.294E-C8
PYR	7.000E-02	-1.079E-15	9	2.559E-C1
NH	4.791E-09	-1.713E-17	10	2.559E-C1
FAD	5.946E-08	-3.446E-18	11	2.849E-C7
FADNH	1.951E-10	-7.093E-19	12	2.849E-C7
FADHH	1.940E-06	4.155E-18	13	1.054E-C7
BOX	C.C	0.0	14	1.054E-C7
FADH	C.C	0.0	15	0.0
BRED	C.C	0.0	16	0.0
ORED	C.C	0.0	17	0.0
			18	0.0
			19	0.0
			20	0.0
			21	0.0

Die Ableitungen der Konzentrationen nach der Zeit ($d(C)/dt$) im letzten Integrationsschritt zeigen, dass sich pro Sekunde nur noch ein Anteil von etwa 10^{-10} der vorhandenen Konzentrationen verändert. (Bei der LDH-Reaktion werden wegen der Verwendung der Rechenmethode nach KING und ALTMAN keine Ableitungen gebildet).

Für jede Reaktion ist Hin- und Rückfluss gleich gross, d.h. die Nettoflüsse sind gleich Null. Das erreichte Gleichgewicht ist also ein thermodynamisches Gleichgewicht. Errechnet man aus dem vorgegebenen Potential $E_{L/P} = -150$ mV und dem Verhältnis ox/red der einzelnen Substanzen die Mittelpotentiale, so ergibt sich

$$\begin{aligned} \text{FAD/FADH}_2 &= 3.06 \cdot 10^{-2} & E_o &= -105 \text{ mV} \\ \text{NAD/NADH} &= 4.52 \cdot 10^5 & E_o &= -314 \text{ mV} \\ \text{LN/LNH} &= 1.29 \cdot 10^3 & E_o &= -240 \text{ mV} \end{aligned}$$

Das veränderte Mittelpotential des NAD/NADH bei Bindung an LDH ergibt sich aus den unterschiedlichen Dissoziationskonstanten des LDH-NAD- und LDH-NADH-Komplexes.

2. Aerobe Titration ($k_{20} = 0.2 \text{ sec}^{-1}$)

Am Endpunkt der Titration der Abb.57 liegen folgende Werte vor:

Name	Konzentration (C)	d (C)/dt	Reakt.-Nr.	Fluss
LDHG	1.000E-06	0.0	1	1.050E-C4
LDH	2.580E-07	0.0	2	1.049E-C4
LNH	2.167E-10	0.0	3	5.908E-C4
LNHPYR	1.904E-07	0.0	4	5.908E-C4
LN	2.933E-07	0.0	5	2.430E-C5
LN1	2.580E-07	0.0	6	2.425E-C5
NAD	1.000E-02	5.187E-12	7	5.103E-C8
LAC	6.712E-02	-4.963E-08	8	1.401E-C9
PYR	7.003E-02	-4.963E-08	9	2.580E-C1
NH	1.257E-10	-9.618E-16	10	2.580E-C1
FAD	1.752E-06	1.664E-12	11	2.203E-C7
FADNH	1.169E-10	-7.829E-16	12	1.706E-C7
FADHH	2.482E-07	-1.663E-12	13	6.311E-C8
BOX	-7.395E-22	8.058E-26	14	1.348E-C8
FADH	-4.185E-17	-9.494E-21	15	-4.992E-21
BRED	-2.136E-20	2.502E-24	16	1.091E-21
ORED	4.885E-04	4.963E-08	17	8.419E-21
			18	-4.565E-21
			19	3.269E-15
			20	4.963E-C8
			21	-4.272E-22

Es sind im Laufe der Titration 0.488 mM ORED entstanden.

Der Fluss der reduzierenden Äquivalente wird durch die Ableitung $d(C)/dt$ dargestellt, die für Lactat $-4.963 \cdot 10^{-8} \text{ (M} \cdot \text{sec}^{-1})$, für Pyruvat und ORED

+ $4.963 \cdot 10^{-8}$ ($M \cdot \text{sec}^{-1}$) beträgt, das bedeutet bei einem Reduktionsgrad des Flavins von 12% einen Umsatz von $0.05 \mu M$ Lactat/sec. Bei höherem Reduktionsgrad ist der Fluss reduzierender Äquivalente sehr viel grösser und der Reduktionsgrad ist nicht stabil, sondern geht in dem Masse zurück, wie sich das $E_{L/P}$ verschiebt. Die Ableitungen der Konzentrationen nach der Zeit zeigen nur noch geringe Substratveränderungen ausser bei ORED. Das Gleichgewicht, das sich einstellt, ist ein steady state, die Flüsse zeigen ein Überwiegen der Hinreaktion gegenüber der Rückreaktion.

Bei der anaeroben Titration ist die Kinetik der Flavinreduktion sehr langsam: die Gleichgewichtseinstellung bei den positiveren Potentialen dauert über 10 Minuten, bei den negativen Potentialen wird sie schneller. Die Zeit der Gleichgewichtseinstellung ist umgekehrt proportional der Flavinkonzentration, der Fluss reduzierender Äquivalente ist unter sonst gleichen Bedingungen also konstant, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion liegt also vor der Flavin-Reduktion.

Die aeroben Titrations zeigen schnelle Gleichgewichtseinstellungen, da für den gleichen Reduktionsgrad des Flavins wie bei den anaeroben Titrations negativere Potentiale, also höhere NADH-Spiegel nötig sind.

Das Mittelpotential der Reduktase liegt nicht bei -109 mV, sondern bei -105 mV. Diese Differenz folgt aus den Konstanten für die LDH-Reaktion, die eine Gleichgewichtskonstante von K'_{eq} von $5.19 \cdot 10^{-12}$ ergeben und nicht den bei den Messungen zugrunde gelegten Wert $K'_{eq} = 2.69 \cdot 10^{-12}$. Damit verschiebt sich in der Rechnung das L/P-Potential um etwa -4 mV, aufgetragen als Potential aber ist in den Abbildungen

das Potential des L/P-Paares mit $E'_0 = -180$ mV.

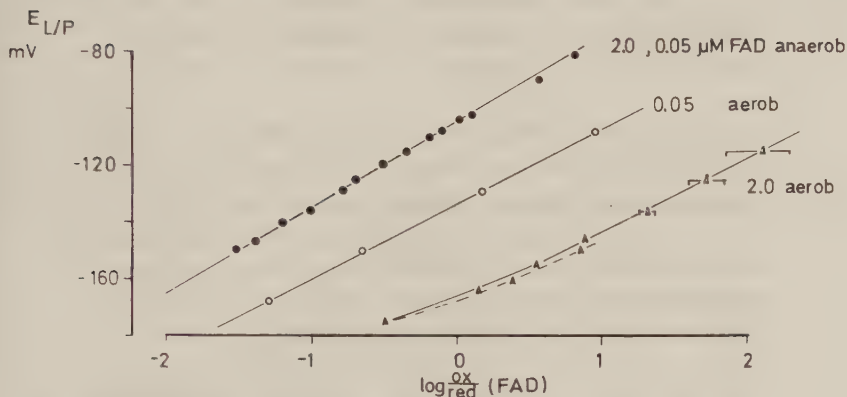


Abb. 58 1 μM LDHG, 1 mM NAD, $k_{20} = 0.2 \text{ sec}^{-1}$ im aeroben System. Reduktase-Konzentration (FAD) 2.0 bzw. 0.05 μM .

Wegen des steady state zum Sauerstoff verschiebt sich die aerobe Titrationskurve und die Steigung der Regressionsgeraden wird flacher. Während die Werte mit 0.05 μM FAD eine Gerade ergeben, ist mit 2 μM FAD die Kurve etwas konkav zum positiven Potential gekrümmt. Diese Krümmung ist aber wenig ausgeprägt bei den Werten innerhalb des Bereiches zwischen $\log os/red = -1$ bis $+1$. Dieser Bereich ist im Experiment am genauesten zu messen. Hier lässt sich in guter Näherung eine Regressionsgerade durch die Werte legen. Dieses Verhalten entspricht auch der experimentellen Titration (siehe 3.5.3.1.1).

E_o bzw. E_a Steigung der
Regressionsgerade
($mV/\Delta \log ox/red = 1$)

FAD 2 μM , 0.05 μM , anaerob:	- 105 mV	30 mV (n = 2)
FAD 0.05 μM , aerob :	- 134 mV	26 mV
FAD 2 μM , aerob :	- 166 mV	21 mV

Die aerobe Redox titration von 2 μM FAD erweist sich als nicht mehr völlig reversibel, die Simulation zeigt eine erhebliche Reduktion von Sauerstoff. Allerdings wird im Experiment eine ähnlich hohe Sauerstoffkonzentration nicht umgesetzt, da nach Erreichen des Gleichgewichts schneller weiter-titriert wird als in der Simulation.

4.2.1.2 Simulation der aeroben $E_{L/P}$ -Titration in Abhängig- keit von Konzentrationen und Geschwindigkeitskonstanten.

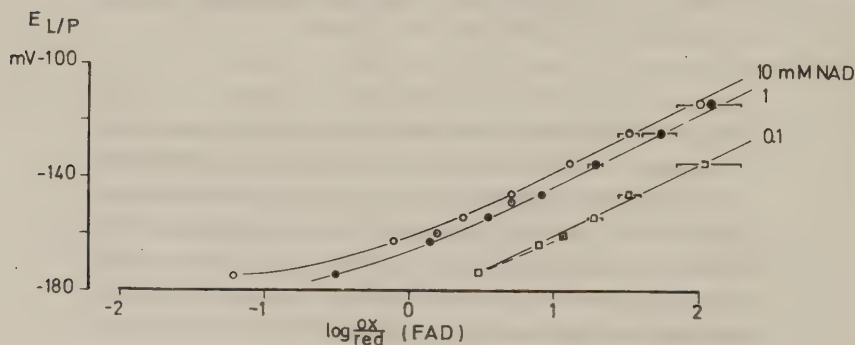


Abb. 59 NAD-Variation, LDHG 1 μM , FAD 2 μM ,
 $k_{20} = 0.2 \text{ sec}^{-1}$

Bei den Variationen der NAD- und LDHG-Konzentrationen und der Autoxidations-Konstante verschiebt sich die aerobe Titrationskurve ohne Veränderung ihrer Form.

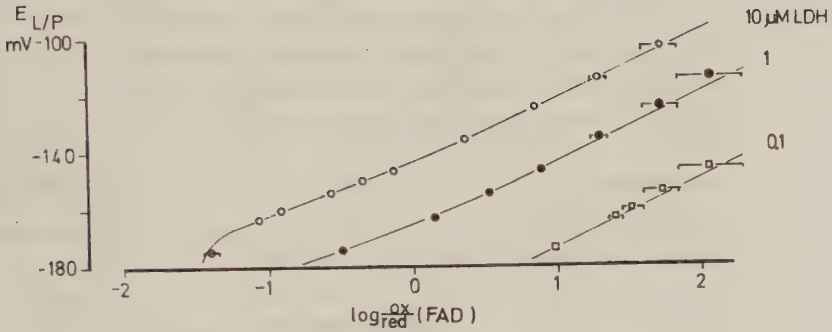


Abb. 60 Abhängigkeit der Redox titration von der LDH-Konzentration.
NAD 1 mM, FAD 2 μM , $k_{20} = 0.2 \text{ sec}^{-1}$

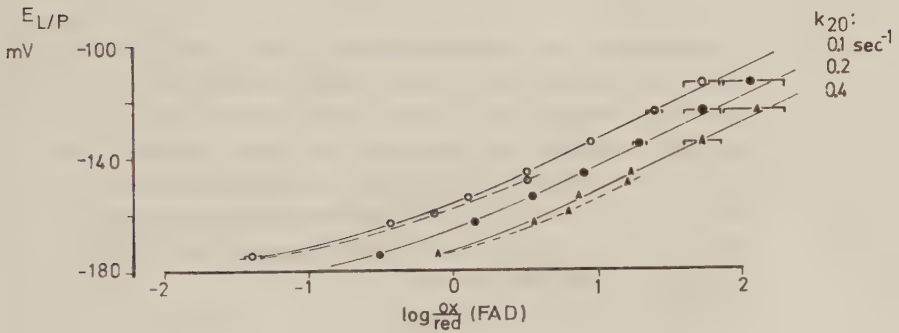


Abb. 61 Abhängigkeit der Redox titration vom k_{20} .
LDHG 1 μM , FAD 2 μM , NAD 1 mM

In der folgenden Tabelle ist unter $[\text{ORED}]_{\text{Ende}}$ die Konzentration von ORED angegeben, die sich im Verlauf der 90 minütigen Titration insgesamt gebildet hat. Wegen der gleichen $E_{L/P}$ -Folge sind sie untereinander vergleichbar.

Bedingung (konstant: FAD 2 μM)		E_a	$[\text{ORED}]_{\text{Ende}}$
(NAD 1 mM, $k_{20} = 0.2$)	LDH 10 μM	- 144 mV	1.3 mM
	1 μM	- 166 mV	0.48
	0.1 μM	- 198 mV (extrapoliert)	0.053
(LDH 1 μM , $k_{20} = 0.2$)	NAD 10 mM	- 162 mV	0.64
	1 mM	- 166 mV	0.48
	0.1 mM	- 183 mV (extrapoliert)	0.14
(LDH 1 μM , NAD 1 mM)	$k_{20} = 0.1 \text{ sec}^{-1}$	- 158 mV	0.41
	0.2	- 166 mV	0.48
	0.4	- 184 mV	0.50

- 4.2.1.3 Veränderung der NAD-Konzentration bei konstantem $E_{L/P}$.
 Eine Titration mit NAD bei festem Lac/Pyr-Verhältnis bewirkt eine Veränderung der Reduktionsgeschwindigkeit, die man anaerob (s.u.) messen kann. im aeroben System resultiert ein Reduktionsgrad, der umso grösser ist, je höher die NAD-Konzentration ist. Dies ist analog der Verschiebung des Mittelpotentials bei NAD-Variation.

Zu Abb. 62: (siehe nächste Seite)

Lac 0.3 mM, Pyr 3 mM, FAD 1 μM , LDH 1 μM , $k_{20} = 0.2 \text{ sec}^{-1}$
 Skalenbreite = FADHH 1 μM , entspricht dem Reduktionsgrad 100% red

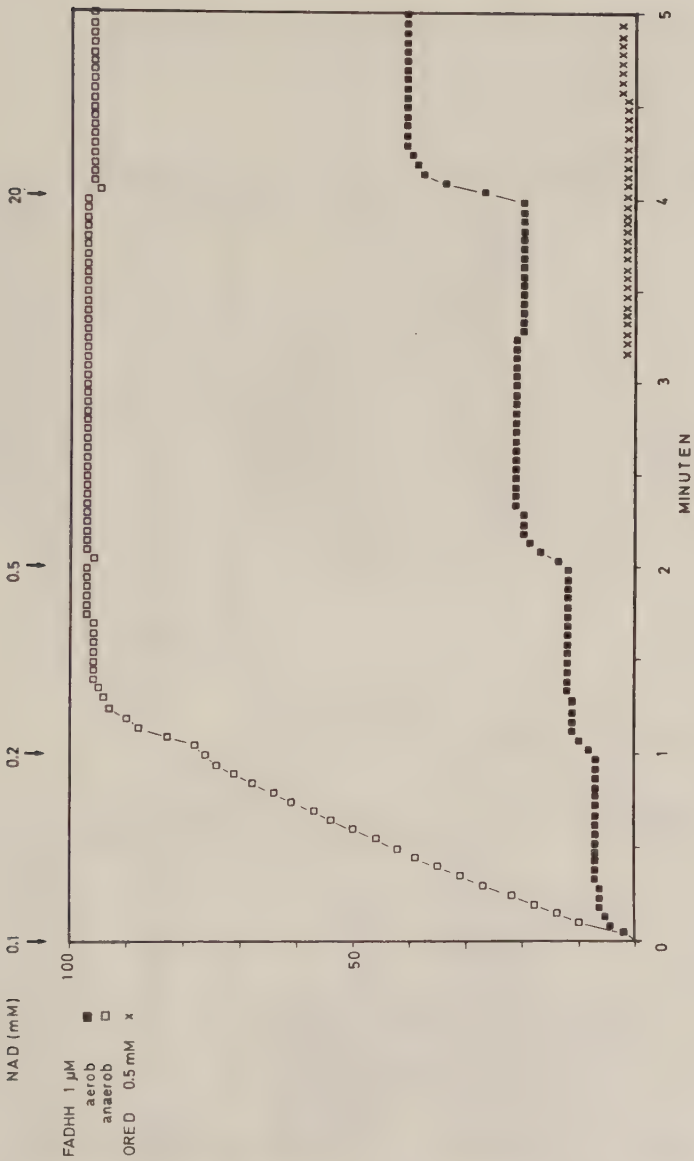


Abb. 62 Aerobe und anaerobe Titration von Reduktase mit NAD bei konstantem $E_{L/P}$

Am Endpunkt der Titration der Abb. 62 liegen folgende Werte vor:

1. Anaerobe Titration

Name	Konzentration (C)	d (C)/dt	Peakt.-Nr	Fluss
LDHG	1.000E-06	0.0	1	1.832E-C4
LDH	2.251E-08	0.0	2	1.832E-C4
LNH	2.940E-10	0.0	3	4.594E-C5
LNHPYR	1.481E-08	0.0	4	4.594E-C5
LN	5.120E-07	0.0	5	1.889E-C6
LN1	4.502E-07	0.0	6	1.889E-C6
NAD	2.000E-02	1.091E-11	7	9.278E-C8
LAC	2.989E-04	-8.970E-16	8	9.278E-C8
PYR	2.001E-02	1.199E-16	9	4.502E-C1
NH	9.545E-08	6.160E-17	10	4.502E-C1
FAD	2.979E-08	-2.770E-18	11	2.843E-C6
FADNH	1.947E-09	1.070E-18	12	2.843E-C6
FADHH	9.683E-07	1.700E-18	13	1.052E-C6
BOX	C.C	0.0	14	1.052E-C6
FADH	C.C	0.0	15	0.0
BRED	C.C	0.0	16	0.0
ORED	C.C	0.0	17	0.0
			18	0.0
			19	0.0
			20	0.0
			21	0.0

2. Aerobe Titration

Name	Konzentration (C)	d (C)/dt	Reakt.-Nr.	Fluss
LDHG	1.000E-06	0.0	1	1.834E-C4
LDH	2.253E-08	0.0	2	1.833E-C4
LNH	3.601E-10	0.0	3	4.422E-C5
LNHPYR	1.422E-08	0.0	4	4.414E-C5
LN	5.123E-07	0.0	5	1.815E-C6
LN1	4.506E-07	0.0	6	1.733E-C6
NAD	2.000E-02	7.354E-12	7	8.479E-C8
LAC	2.877E-04	-8.228E-08	8	2.510E-C9
PYR	3.012E-02	8.228E-08	9	4.506E-C1
NH	2.580E-09	-1.326E-12	10	4.506E-C1
FAD	5.870E-07	1.245E-10	11	1.515E-C6
FADNH	5.810E-10	-2.957E-13	12	1.432E-C6
FADHH	4.120E-07	-1.242E-10	13	5.298E-C7
BOX	C.C	0.0	14	4.473E-C7
FADH	C.C	0.0	15	0.0
BRED	C.C	0.0	16	0.0
ORED	1.193E-05	8.241E-C8	17	0.0
			18	0.0
			19	6.709E-14
			20	8.241E-C8
			21	0.0

Die Simulation der anaeroben Titration zeigt die lineare Reduktionsgeschwindigkeit bis zu einem Reduktionsgrad von 70%. Es stellt sich dann der dem Redoxpotential entsprechende Reduktionsgrad ein, die Ableitung der Konzentrationen $d(C)/dt$ zeigen das thermodynamische Gleichgewicht, die Hin- und Rückflüsse der einzelnen Reaktionen sind gleich. Der anaerobe Titrationsverlauf des FADHH zeigt, dass das im Gleichgewicht befindliche FADHH bei NAD-Zugabe vorübergehend oxidiert wird, da momentan die grössere NAD-Konzentration ein positiveres Redox-Potential am FADHH bewirkt, das erst langsamer vom Redox-Puffer ausgeglichen wird. Wird die gleiche NAD-Titration aerob simuliert, ergeben sich steady states, bei denen der FAD-Reduktionsgrad mit der NAD-Konzentration steigt (siehe Abb. 63). Dies entspricht dem Experiment in 3.5.3.2.

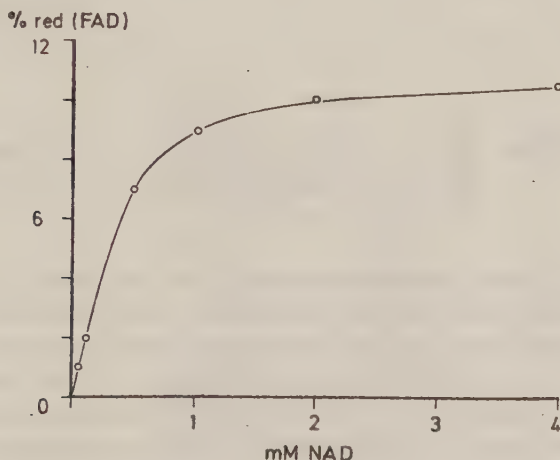


Abb. 63 1 μ M Reduktase, 1 μ M LDHG, $E_{L/P} = -135$ mV

Der Reduktionsgrad des Flavins ist also gekennzeichnet durch Gleichgewicht zwischen Fluss zum Sauerstoff

(ORED-Entstehung), der eine Funktion der Flavinkonzentration, des Reduktionsgrades und der Geschwindigkeitskonstante ist, und Fluss vom Lactat zum FAD, der von allen anderen Konzentrationen und Konstanten abhängt.

4.2.1.4 Anaerobe Reduktionskinetik

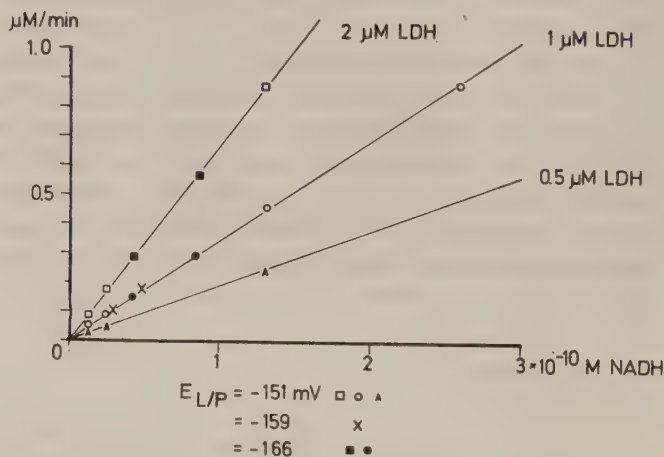


Abb. 64 Anaerobe Reduktionskinetik der Reduktase, Variation der NAD-Konzentration bei verschiedenen LDHG-Konzentrationen und Lac/Pyr-Quotienten.

Die Reduktionsgeschwindigkeit des Flavins ist linear bis zu einem Reduktionsgrad von etwa 70%. Sie ist proportional der NADH-Konzentration mindestens bis zu dem ausserhalb des Bereichs der Abb. 64 liegenden Wertes $15 \cdot 10^{-10} \text{ M NADH}$. Der NADH-Spiegel lässt sich indirekt sowohl durch Veränderung der NAD-Konzentration bei festem $E_{L/P}$ wie auch umgekehrt durch $E_{L/P}$ -Veränderung bei fester NAD-Konzentration beeinflussen. Bei beiden Titrationsarten zeigt die Simulation gleiche Reduktionsgeschwindigkeiten bezogen auf die NADH-Konzentration.

Ausserdem hängt die Reaktionsgeschwindigkeit von der LDH-Konzentration ab:

LDH-Konz. (μM b.s.)	Reduktionsgeschwindigkeit (μM FAD/min/ $1 \cdot 10^{-10}$ μM NADH)
0.5	0.185
1	0.330
2	0.61
(Reduktase 1 μM)	

4.2.2 Simulation des anaeroben und aeroben Cyt. b_5 -Systems

4.2.2.1 Die Redoxtitration des Cyt. b_5 anaerob und aerob

Am Titrationsendpunkt der Abb. 65 (s.u.) liegen folgende Werte vor:

1. Anaerobe Titration

Name	Konzentration (C)	d (C)/dt	Reakt.-Nr.	Fluss
LDHG	1.000E-06	0.0	1	3,180E-05
LDH	7.814E-07	0.0	2	3,180E-05
LNH	6.864E-17	0.0	3	1,600E-04
LNHPYR	5.158E-06	0.0	4	1,600E-04
LN	8.886E-06	0.0	5	6,581E-06
LN1	7.814E-06	0.0	6	6,581E-06
NAD	1.000E-04	3,638E-12	7	1,617E-08
LAC	6.000E-03	1,711E-16	8	1,617E-08
PYR	6.000E-02	-6,005E-17	9	7,814E-02
NH	4.791E-10	1,747E-17	10	7,814E-02
FAD	1.271E-09	-3,905E-18	11	6,088E-10
FADNH	4.170E-13	1,430E-20	12	6,088E-10
FADHH	4.147E-06	1,476E-17	13	2,252E-10
BDX	7.845E-09	-1,454E-17	14	2,252E-10
FADH	7.259E-09	-1,083E-17	15	8,849E-09
BRED	9.992E-06	1,454E-17	16	8,849E-09
URED	0.0	0.0	17	1,549E-09
			18	1,549E-09
			19	0.0
			20	0.0
			21	0.0

2. Aerobe Titration

Name	Konzentration (C)	d (C)/dt	Reakt.-Nr.	Fluss
LDHG	1.000E-04	0.0	1	3,181E-05
LDH	7.817E-07	0.0	2	3,181E-05
LNH	6.799E-17	0.0	3	1,586E-04
LNHPYR	5.117E-08	0.0	4	1,586E-04
LN	8.889E-08	0.0	5	6,523E-06
LN1	7.817E-08	0.0	6	6,519E-06
NAD	1.000E-04	1.058E-12	7	1,601E-08
LAC	5.945E-03	-4.570E-09	8	1,144E-08
PYR	6.000E-02	4.570E-09	9	7,817E-02
NH	3.389E-16	-2.792E-16	10	7,817E-02
FAO	4.995E-08	4.738E-17	11	1,693E-08
FADNH	8.464E-12	-6.964E-18	12	1,236E-08
FADHH	1.760E-17	-1.524E-17	13	4,570E-09
BOX	9.543E-06	4.062E-13	14	9,556E-14
FADH	2.831E-17	-2.521E-17	15	4,568E-09
BRED	4.567E-07	-4.062E-13	16	1,578E-12
URED	1.785E-04	9.138E-09	17	7,350E-09
			18	2,783E-09
			19	8,812E-15
			20	3,520E-12
			21	9,134E-09

Im anaeroben System reduziert sich das Cyt.b₅ mit einer Geschwindigkeit, die vom Redox-Potential abhängt. Während dieser Reduktion ist FADHH unter 0.5% red und damit nicht sichtbar. Erst bei vollständiger Reduktion des Cyt.b₅ wird FADHH innerhalb 3 Minuten gebildet und erreicht den Reduktionsgrad, der dem thermodynamischen Gleichgewicht bei diesem Potential entspricht. Die Konzentration an FADH-Semichinon wird schon bei einem Reduktionsgrad des Cyt.b₅ von 10% sichtbar (über 0.05% red, die FADH-Skala ist gegenüber der FADHH-Skala zehnfach gespreizt). Sie steigt ab einem Cyt.b₅-Reduktionsgrad von etwa 50% sehr schnell an, hat an dem Zeitpunkt der vollständigen Cyt.b₅-Reduktion ein Maximum und geht dann in das thermodynamische Gleichgewicht bei einem niedrigeren Reduktionsgrad.

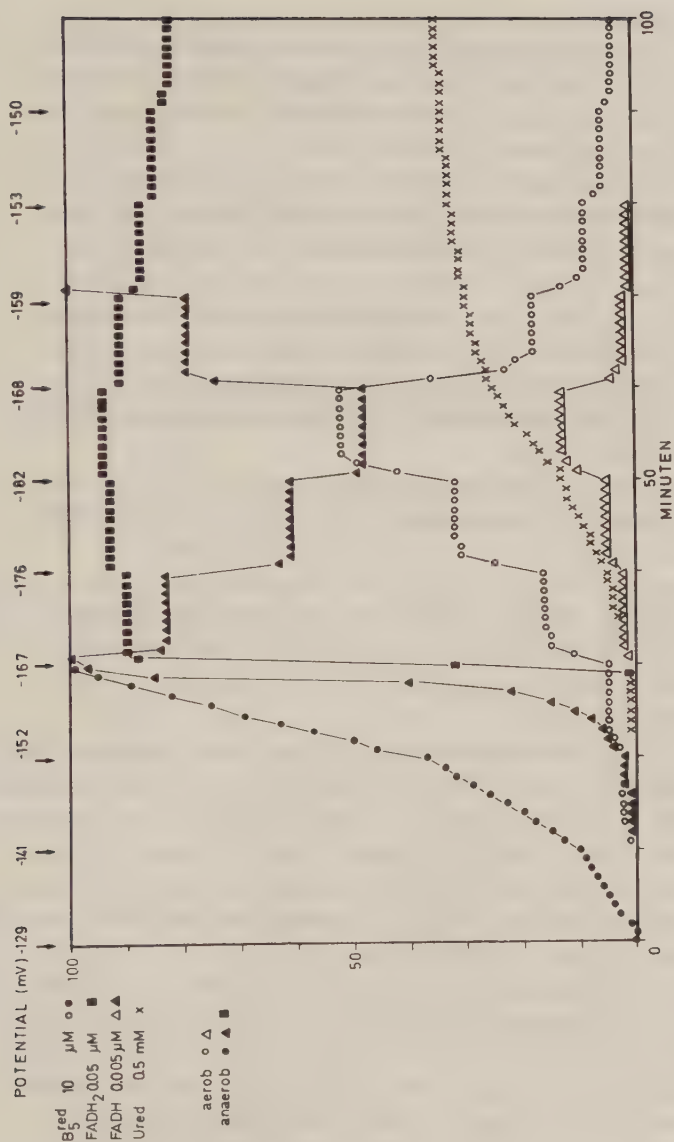


Abb. 65 Simulation einer anaeroben und aeroben Redox titration von Cyt. b_5
 LDH $1 \mu M$, Reduktase $0.05 \mu M$, Cyt. b_5 $10 \mu M$, NAD $0.1 \mu M$
 $k_{20} = 0.2$, $K_M(b_5) = 39 \mu M$, $E_0(b_5) = 31 mV$ ($k_{15} = k_{17} = 2.72E7$)
 ($k_{16} = k_{18} = 1.22E5$)

Veränderung des FAD/FADHH-Gleichgewichtes durch $E_{L/P}$ -Verschiebung verschiebt den FADH- entgegengesetzt zum FADHH-Reduktionsgrad. Die Konzentrationen an FADH und BOX sind etwa gleich gross und verändern sich parallel.

Trotz der nur noch geringen Veränderung der BRED-Konzentration ($+ 1.5 \cdot 10^{-17} \text{M/sec}$) ist das thermodynamische Gleichgewicht des Cyt. b_5 noch nicht erreicht. Das Ist-Potential des Cyt. b_5 beträgt - 60 mV und ist damit nach 90 mV vom eingestellten Potential entfernt. Die Differenz zum Gleichgewicht ist aber nur noch etwa $5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ Cyt. b_5 entsprechend 0.5 % der eingesetzten Cyt. b_5 -Konzentration.

Die gleiche Titration aerob simuliert zeigt eine typische Titrationskurve mit dem stabilen Reduktionsgrad des Cytochroms in Abhängigkeit vom Redoxpotential. Durch den steady state ergeben sich für die reduzierten Formen des FAD sehr niedrige Konzentrationen, In der Abbildung 64 ist wegen der 10-fachen Spreizung der FADH-Konzentration nur FADH zu sehen.

Die Sauerstoff-Konzentration am Titrationsende beträgt 0.178 mM URED, das entspricht einer Umwandlung von 0.089 mM Lactat in Pyruvat während der gesamten Titration. Seit der letzten Lactat-Zugabe in der 50. Minute sind 0.055 mM Lactat, seit der letzten Pyruvat-Zugabe in der 90. Minute weniger als 0.005 mM Lactat umgewandelt worden.

Die Autoxidations-Reaktionen von NADH und FADHH sind gegenüber der von Cyt. b_5 völlig zu vernachlässigen. Sie ergeben zusammen nur 0.3% des Flusses der Reaktion k_{21} . Daher entspricht der Nettofluss über alle Reaktionen dem Autoxidationsfluss des Cyt. b_5 , das steady state ist erreicht. Die Konzen-

trationsänderungen des Lactat mit $- 4.57 \cdot 10^{-9}$ M/sec (Pyruvat gleicher Wert mit positivem Vorzeichen) ist fast gleich der des ORED mit $2 \cdot 4.57 \cdot 10^{-9}$ M/sec (9.138 M/sec), die Differenz von $2 \cdot 10^{-12}$ ist ebenso wie die übrigen Konzentrationsänderungen von 10^{-13} bis 10^{-18} durch die noch nicht völlige Annäherung an die steady state-Konzentrationen bedingt.

Zu Abb. 66 (siehe nächste Seite)

Die aerobe Cyt. b_5 -Titration entspricht der in Abb. 65, abweichend davon ist NAD 1 mM und die Skala von FADH ist nicht gespreizt, o - 100 entspricht Reduktionsgrad o - 100%, FADHH, FADH.

Am Titrationsendpunkt der Abb. 66 liegen folgende Werte vor:

Name	Konzentration (C)	d (C)/d t	Reakt.-Nr.	Fluss
LDH	1.000E-06	0.0	1	1,077E-04
LDH	2.648E-07	0.0	2	1,077E-04
LNH	2.247E-10	0.0	3	5,247E-04
LNHPYK	1.691E-07	0.0	4	5,247E-04
LN	3.911E-07	0.0	5	2,158E-05
LN1	2.648E-07	0.0	6	2,155E-05
NAD	1.000E-03	5.956E-12	7	5,292E-08
LAC	5.267E-13	-2.853E-08	8	2,438E-08
PYK	6.000E-02	2.853E-08	9	2,648E-01
NH	2.137E-19	-1.060E-14	10	2,648E-01
FAD	4.956E-08	3.937E-15	11	1,057E-07
FADNH	5.266E-11	-2.592E-16	12	7,717E-08
FADHH	1.470E-10	-1.124E-15	13	2,854E-08
ROX	7.142E-06	1.950E-11	14	7,983E-12
FADH	2.382E-10	-1.252E-15	15	2,859E-08
BRED	2.851E-06	-1.950E-11	16	8,185E-11
ORED	6.256E-06	2.946E-11	17	4,575E-08
URED	6.714E-04	5.703E-08	18	1,724E-08
			19	5,545E-14
			20	2,940E-11
			21	5,703E-08

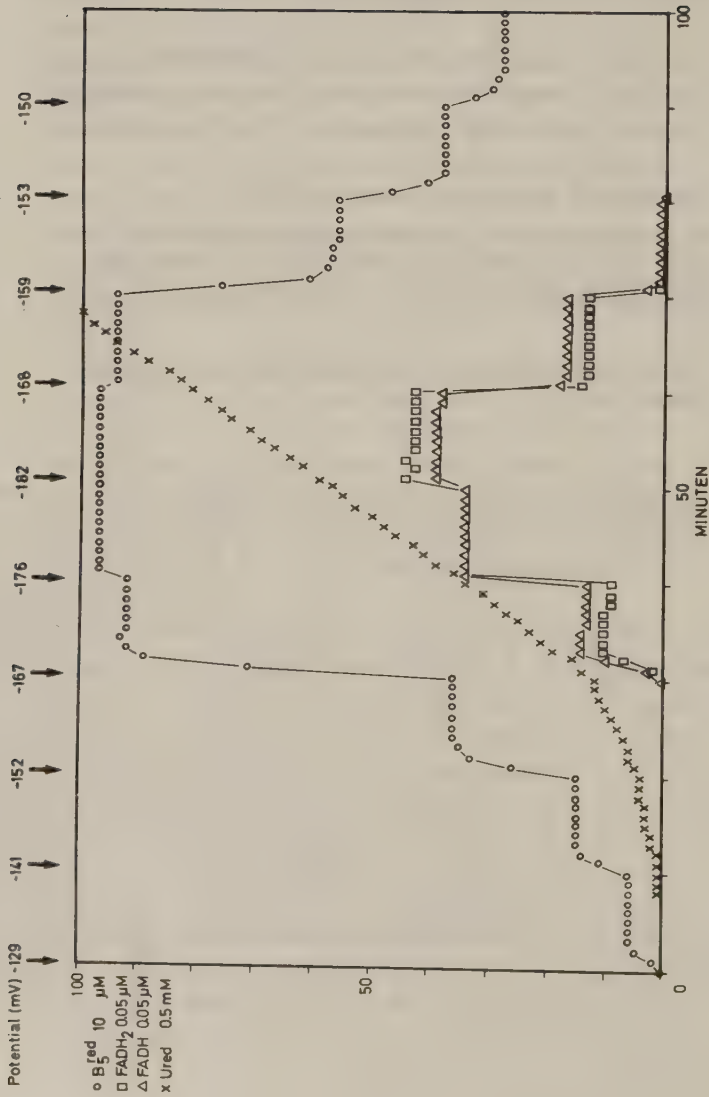


Abb. 66 Aerobe Cyt._b₅-Titration wie in Abb.65, aber mit NAD 1 mM

Entsprechend der 10-fach höheren NAD-Konzentration ist der Fluss zum Cyt. b_5 erheblich grösser. Die Fließgleichgewichte liegen bei höheren Reduktionsgraden des Cyt. b_5 . Sobald er über 90% liegt, steigen auch die FADH und FADHH-Konzentrationen stark an und erreichen beim Potential - 182 mV Werte um 40%. Am Endpunkt der Titration ist 0.677 mM URED und 0.006 mM ORED entstanden, es bildete sich also 5 mal mehr ORED als bei der Redoxtitration mit einem Zehntel der NAD-Konzentration (Abb. 65).

4.2.2.2 Die Abhängigkeit des aeroben Cyt. b_5 -Systems von den Konzentrationen und Geschwindigkeitskonstanten

Abhängigkeit des E_a (Cyt. b_5) von der NAD-Konzentration

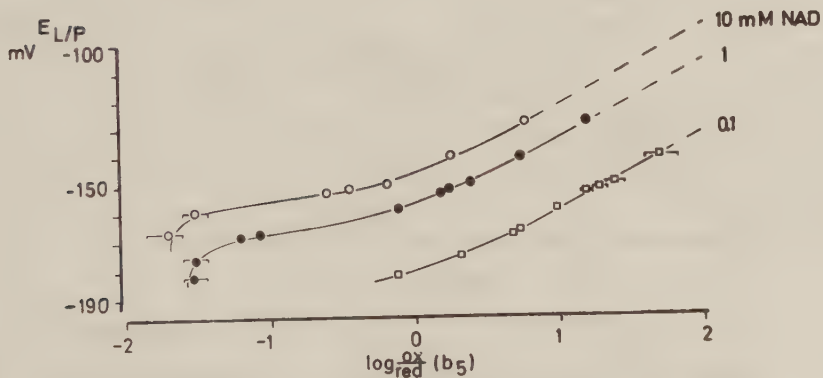


Abb. 67 Simulation der NAD-Abhängigkeit der Redox-titration
 LDHG 1 μ M, FAD 0.05 μ M, Cyt. b_5 , 10 μ M, Lac 0.1-6mM
 Pyr. 5 - 60 mM
 Die Simulation ergab identische Werte mit:
 a) $K_M(b_5) = 39 \mu$ M, $E_o(b_5) = 31$ mV ($k_{15}=k_{17}=2.72E7$
 $k_{16}=k_{18}=1.22E5$)
 b) $K_M(b_5) = 20 \mu$ M, $E_o(b_5) = 0$ mV ($k_{15}=1.62E8$,
 $k_{17}=8.1 E8$)
 $k_{16}=k_{18}=5.3E6$)

NAD	$E_a(\text{Cyt.}b_5)$	URED (Ende)
10 mM	- 147 mV	0.985 mM
1	- 157	0.684
0.1	- 181	0.178

(Die Endkonzentrationen an URED sind miteinander vergleichbar, wenn die gleiche Titrationsfolge verwendet wurde).

Abhängigkeit des $E_a(\text{Cyt.}b_5)$ von der LDH-Konzentration

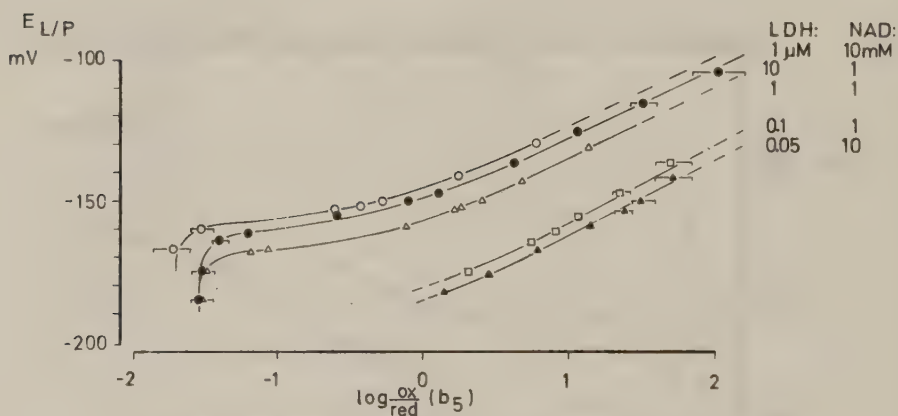


Abb. 68 Veränderung der NAD- und der LDH-Konzentration Cyt. b_5 10 μM , FAD 0.05 μM

LDH	NAD	$E_a(\text{Cyt.}b_5)$	[URED] Ende
10 μM	1 mM	- 149 mV	0.6033 mM
1	1	- 157	0.448
0.1	1	- 178	0.098
1	10	- 146	0.936
0.05	10	- 191	0.143

Die Titrations mit 10 mM NAD wurden mit einer anderen $E_{L/P}$ -Folge simuliert als diejenigen mit 1 mM NAD, die URED-Werte sind nur innerhalb einer Folge miteinander vergleichbar.

Die Titrationskurven verschieben sich im wesentlichen ohne Veränderung ihrer Form, die beiden negativsten Titrationskurven sind ein wenig steiler als die bei positivem Potential.

Abhängigkeit des E_a (Cyt. b_5) von der FAD-Konzentration

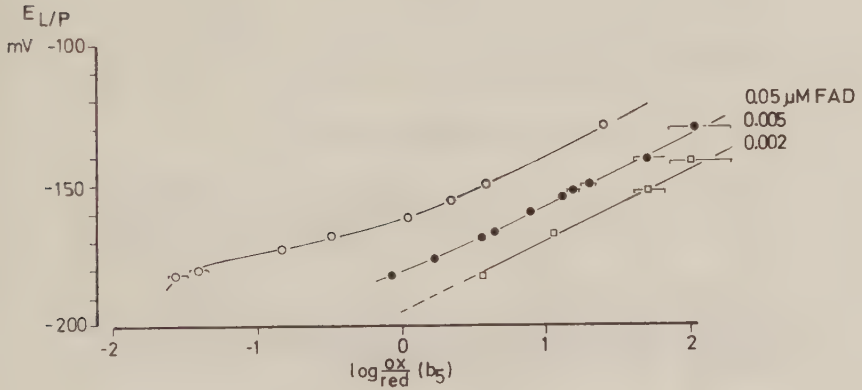


Abb. 69 10 μM Cyt. b_5 , 1 mM NAD, 1 μM LDHG

FAD	E_a (Cyt. b_5)
0.05 μM	- 147 mV
0.005	- 181
0.002	- 195 (extrapoliert)
(Cyt. b_5 10 μM)	

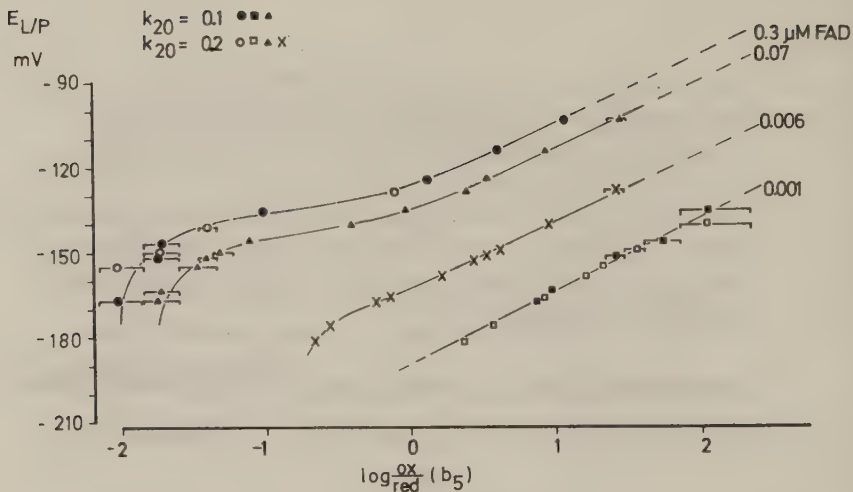


Abb. 7o 0.7 μM Cyt. b_6 , 0.2 mM NAD, 1 μM LDH

(0.7 μM b_5 , 0.2 mM NAD, 1 μM LDHG, $k_{20} = 0.1$)

FAD	E_a (Cyt. b_5)	[ORED] _{Ende}	[URED] _{Ende}
0.3 μM	- 127 mV	0.044 mM	0.063 mM
0.07	- 135	0.0077	0.056
0.006	- 163	0.0042	0.038
0.001	- 190 (extra- poliert)	$1.34 \cdot 10^{-5}$	0.0044

Auffällig ist, dass die Kurven nicht nur verschoben sind, sondern auch ihre Form ändern. Je negativer das scheinbare Mittelpotential liegt, umso steiler und umso linearer ist die Kurve. In der Simulation mit 0.001 μM FAD beträgt die Steigung der Geraden $27 \text{ mV}/\Delta \log \text{ox/red} = 1$, der Faktor n' ist also fast ebenso gross wie n im Fall des thermodynamischen Gleichgewichts ($n = 2$).

Abhängigkeit des E_a von der Cyt. b_5 -Konzentration

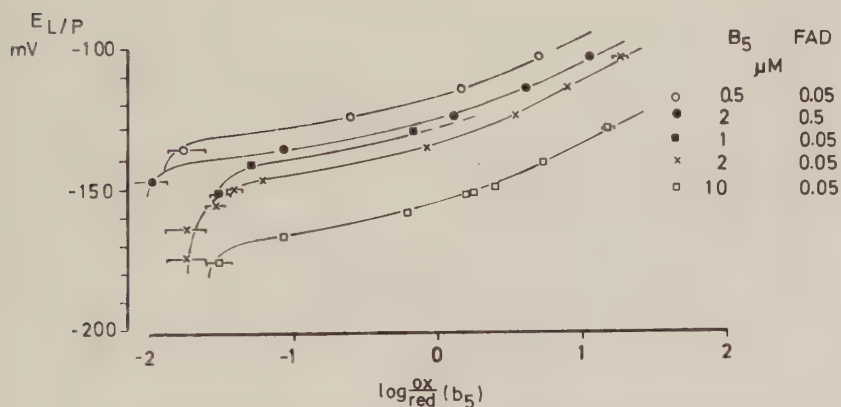


Abb. 71 1 mM NAD, 1 μ M LDHG

Cyt. b_5	FAD	E_a (Cyt. b_5)	[URED] _{Ende}
0.5 μ M	0.05 μ M	- 116 mV	0.068 mM
1	0.05	- 128	0.125
2	0.05	- 136	0.173
10	0.05	- 157	0.678
2	0.5	- 126	0.342

Abhängigkeit des E_a von den Geschwindigkeitskonstanten

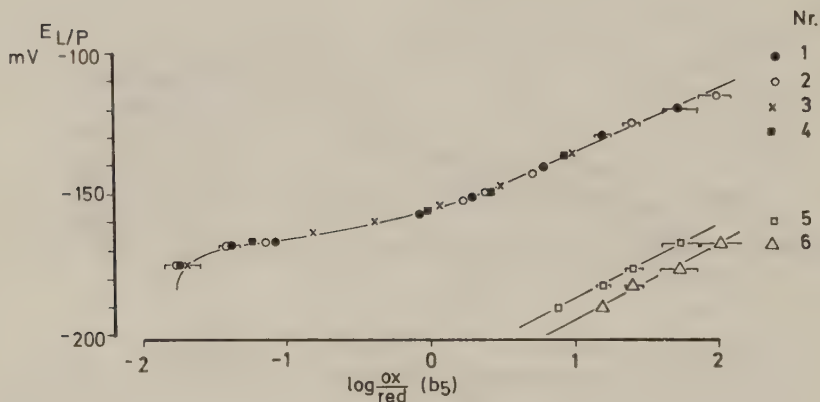


Abb. 72 Variation der Geschwindigkeitskonstanten
1 μM LDHG, 1 mM NAD, 0.05 μM FAD, 10 μM b_5

Nr	$E_o(b_5)$ (mV)	$K_M(b_5)$ (μM)	$E_o(\text{FAD})$ (mV)	k_{14}	k_{15}	k_{16}	k_{17}	k_{18}	E_a (mV)
2	0	20	-106	5.4E1	1.6E8	5.3E6	8.1E8	5.3E6	-147
1	0	39	-106	5.4E1	5.5E6	1.2E5	2.7E7	1.2E5	-147
7	31	39	-106	5.4E1	2.5E6	1.2E5	2.7E7	1.2E5	-147
3	0	2	-106	5.4E1	3.2E8	1.1E7	1.6E9	1.1E7	-147
4	0	2	-195	3.7E4	3.2E8	4.1E5	1.6E9	4.1E5	-147
5	-150	40	-185	3.7E7	2.7E7	4.8E2	2.7E7	4.8E2	-215
6	-39	20	-285	3.7E7	1.6E7	6.4E3	8.1E8	6.4E3	-224

(Die Titration der Konstanten-Kombination Nr.7 wurde auch mit 0.1 mM und 10 mM NAD simuliert und ergab Kurven, die gleichartig verschoben waren wie bei der NAD-Variation der Kombination Nr.2)

Der Wert der Geschwindigkeitskonstante k_{20} beeinflusst die Lage der Titrationskurve nicht (siehe Abb.70).

Die Titrationskurven Nr. 1, 2, 3, 4 und 7 unterscheiden sich nicht voneinander, 5 und 6 liegen 70 - 80 mV negativer, der E_a -Wert ist extrapoliert.

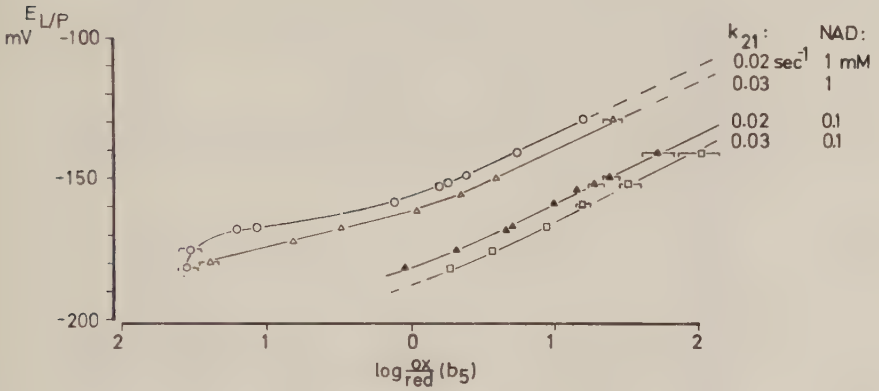


Abb. 73 Abhängigkeit des E_a von k_{21} , bei 1 und 0.1 mM NAD, 1 μ M LDHG, 10^a μ M Cyt.b₅, 0.05 μ M FAD.

Die Lage des steady state und damit E_a ist von k_{21} abhängig

NAD	k_{21}	E_a	$[URED]_{\text{Ende}}$
1 mM	0.02 sec ⁻¹	- 157 mV	0.684 mM
1	0.03	- 162	0.674
0.1	0.02	- 181	0.1785
0.1	0.03	- 186	0.1790

Die $[URED]_{\text{Ende}}$ -Konzentration der Titration 1 mM NAD, $k_{21} = 0.03$ ist mit den übrigen wegen einer etwas

anderen $E_{L/P}$ -Folge während der Titration nicht völlig vergleichbar.

Bei beiden NAD-Konzentrationen verschiebt die k_{21} -Veränderung die Titrationskurve um 5 mV ohne Veränderung der Form und fast ohne Veränderung des Sauerstoff-Flusses.

4.2.2.3 Abhängigkeit des Cyt. b_5 -Reduktionsgrades von der NAD-Konzentration bei konstantem $E_{L/P}$

zu Abb. 74 (siehe nächste Seite)

Am Endpunkt der Titration der Abb. 74 liegen folgende Werte vor:

1. Anaerobe Titration

Name	Konzentration (C)	$d(C)/dt$	Reakt.-Nr.	Fluss
LDHG	1.000E-06	0.0	1	1.832E=C4
LOH	2.251E-08	0.0	2	1.832E=C4
LNH	2.946E-10	0.0	3	4.600E=C5
LNHPYR	1.483E-08	0.0	4	4.600E=C5
LN	5.120E-07	0.0	5	1.892E=C6
LN1	4.502E-07	0.0	6	1.892E=C6
NAD	2.000E-02	1.839E-11	7	9.293E=C8
LAC	2.994E-04	-2.142E-13	8	9.293E=C8
PYR	2.001E-03	2.144E-13	9	4.502E=C1
NH	9.560E-08	1.843E-14	10	4.502E=C1
FAD	1.271E-09	1.039E-14	11	1.215E=C7
FADNH	8.323E-11	7.073E-15	12	1.215E=C7
FADHH	4.139E-08	3.659E-13	13	4.495E=C8
BOX	7.859E-10	-3.571E-14	14	4.495E=C8
FADH	7.259E-09	-3.770E-13	15	8.847E=C10
BRED	9.992E-07	3.571E-14	16	8.849E=C10
URED	C.C	0.0	17	1.552E=C10
			18	1.550E=C10
			19	0.0
			20	0.0
			21	0.0

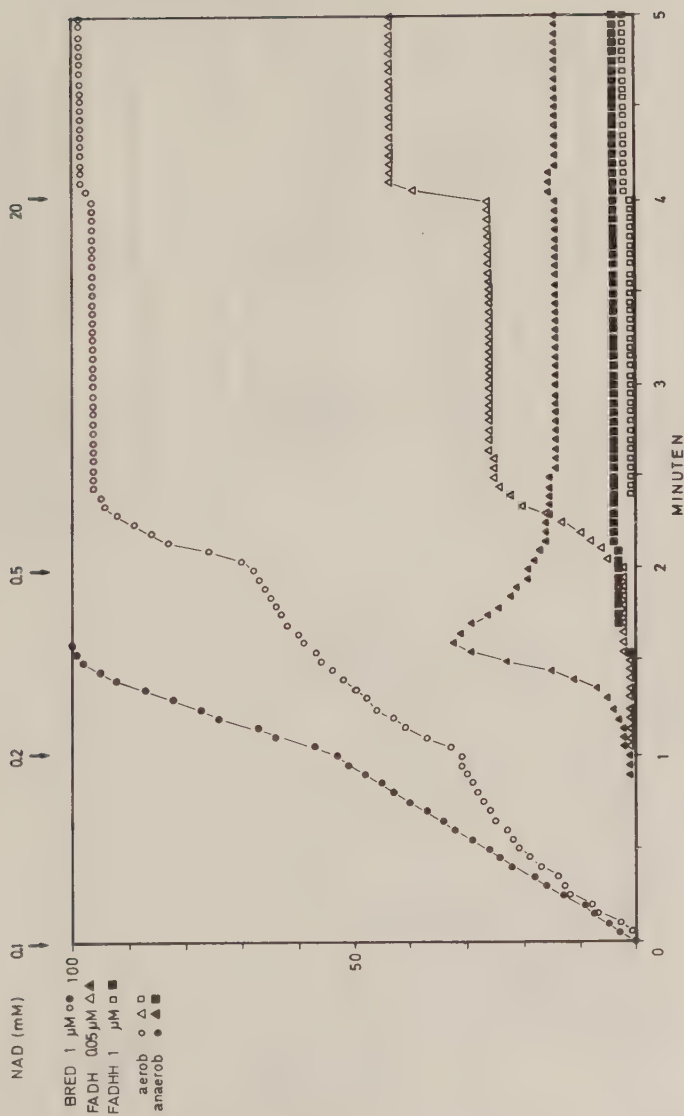


Abb. 74: 1 μM Cyt. b_5 , 0.05 μM FAD, 1 μM LDHG, $E_{L/P} = -151 \text{ mV}$

2. Aerobe Titration

Name	Konzentration (C)	d(C)/dt	Reakt.-Nr.	Fluss
LDHG	1.000E-06	0,0	1	1.832E=C4
LDH	2.252E-08	0,0	2	1.832E=C4
LNH	2.874E-10	0,0	3	4.559E=C5
LNHPYR	1.469E-08	0,0	4	4.558E=C5
LN	5.121E-07	0,0	5	1.873E=C6
LN1	4.503E-07	0,0	6	1.859E=C6
NAD	2.000E-02	9.194E-12	7	9.124E=C8
LAC	2.967E-04	-1.516E-08	8	7.609E=C8
PYR	2.003E-03	1.516E-08	9	4.503E=C1
NH	7.826E-08	-5.278E-12	10	4.503E=C1
FAD	1.717E-09	1.120E-13	11	1.344E=C7
FADNH	8.168E-11	-1.944E-16	12	1.192E=C7
FADHH	2.665E-08	-0.126E-14	13	4.410E=C8
BOX	1.712E-08	4.634E-14	14	2.895E=C8
FADH	2.155E-08	-3.051E-14	15	1.241E=C8
BRED	5.825E-07	-4.634E-14	16	2.584E=C9
URED	4.889E-06	2.499E-08	17	1.003E=C8
			18	2.059E=C10
			19	2.033E=C12
			20	5.331E=C9
			21	1.966E=C8

4.2.2.4 Anaerobe Reduktionskinetik des Cyt.b₅

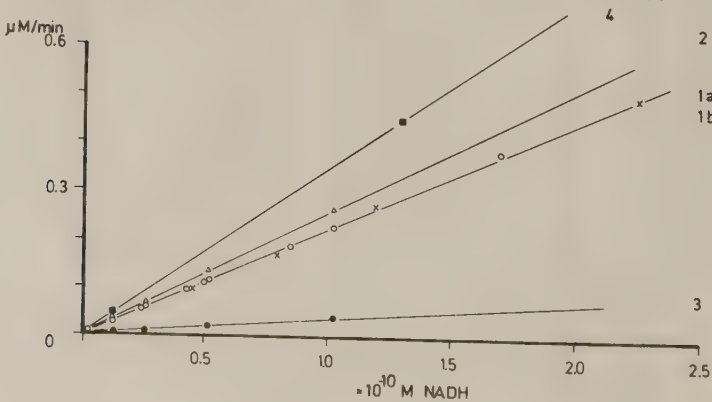


Abb. 75 Anaerobe Anfangsgeschwindigkeit der Cyt.b₅-Reduktion in Abhängigkeit vom NADH-Spiegel.

Nr	LDHG (μM)	FAD (μM)	b_5 (μM)	$\text{E}_{\text{L/P}}$ (mV)	NAD (mM)	$\frac{\mu\text{M } \text{b}_5 \text{ reduziert}}{1 \cdot 10^{-10} \text{ M NADH} \cdot \text{min}}$
1a	1	0.05	10	-108	1	
				-129	0.1, 0.5, 1.0	
				-141	0.1	
b	1	0.05	1	-151	0.1, 0.04, 0.02, 0.02	0.225
				-159	0.02, 0.01, 0.005	
				-166	0.02, 0.01, 0.005	
2	2	0.05	1	-151	0.04, 0.02, 0.01, 0.005	0.28
3	0.5	0.05	1	-161	0.04, 0.02, 0.01, 0.005	0.04
4	1	0.1	1	-151	0.005, 0.05	0.34

Die Reduktionsgeschwindigkeit des Cyt. b_5 hängt also linear von der NADH-Konzentration ab, mindestens bis zu einem Bereich bei $7.5 \cdot 10^{-10} \text{ M NADH}$ (ausserhalb der Darstellung Abb. 75). Der NADH-Spiegel lässt sich bei konstantem $\text{E}_{\text{L/P}}$ durch NAD-Variation und bei konstanter NAD-Konzentration durch $\text{E}_{\text{L/P}}$ -Veränderung variieren.

Auffällig ist die Abhängigkeit von der LDH-Konzentration. Während die Reduktionsgeschwindigkeit des FAD nahezu proportional der LDH-Konzentration war (bei $1 \mu\text{M}$ FAD, siehe 4.3.1.3), verfünffacht sich hier (bei $0.05 \mu\text{M}$ FAD) die Reduktionsgeschwindigkeit bei Verdoppelung der LDH-Konzentration von 0.5 auf $1 \mu\text{M}$, steigt dann bei nochmaliger Verdoppelung von 1 auf $2 \mu\text{M}$ LDH nur noch um 30% .

Weiter hängt die anaerobe Cyt. b_5 -Reduktionsgeschwindigkeit von der Reduktase-Konzentration ab, bei $0.1 \mu\text{M}$ FAD liegt sie 50% über der Geschwindigkeit bei $0.05 \mu\text{M}$ FAD.

Eine Veränderung der Cyt. b_5 -Konzentration beeinflusst die Reduktionsgeschwindigkeit nicht.

4.2.3

Das Potentialgefälle in der Redox-Kette

Bedingung	Fluss ORED bzw URED (M/sec)	$E_{L/P}$ (mV)	$E_{LN/LNH}$ (mV)	E_{NAD} (mV)	E_{FAD} (mV)	E_{BRED} (mV)
<u>- FAD-Titration</u>						
<u>anaerob</u>						
Bedingung 1	-	-150.8	-150.5	-155.7	-150.6	-
<u>aerob</u>						
1 mM NAD	$4.96 \cdot 10^{-8}$	-150.4	-149.3	-110	- 83	-
10 mM NAD	$6.5 \cdot 10^{-8}$	-150.3	-149.1	- 96	- 87	-
$k_{20} = 0.1$	$4.96 \cdot 10^{-8}$	-150.4	-149.3	-113	- 94	-
$k_{20} = 0.4$	$4.97 \cdot 10^{-8}$	-150.4	-149.3	-108	- 73	-
0.1 μ M LDH	$5.24 \cdot 10^{-9}$	-150.4	-149.7	- 80	- 53	-
10 μ M LDH	$2.73 \cdot 10^{-7}$	-150.4	-149.4	-143	-117	-
<u>- Cyt.b₅-Titration</u>						
<u>anaerob</u>						
Bedingung 2	-	-150.8	-150.5	-155.7	-150.2	- 60
<u>aerob</u>						
0.1 mM NAD	$9.14 \cdot 10^{-9}$	-150.5	-149.4	-151.5	- 7.9	+ 69
1 mM NAD	$5.7 \cdot 10^{-8}$	-150.5	-149.3	-144.5	- 34.7	+ 42
10 mM NAD	$1.2 \cdot 10^{-7}$	-150.5	-149.5	-126	- 52.5	+ 26
$k_{21} = 0.02$	$9.14 \cdot 10^{-9}$	-150.8	-149.4	-151.5	- 7.9	+ 69
$k_{21} = 0.03$	$9.14 \cdot 10^{-9}$	-150.8	-149.3	-151.4	- 7.6	+ 75
Bed. 3						
0.1 μ M LDH	$9.7 \cdot 10^{-9}$	-150.4	-149.7	-123	- 8.7	+ 68
10 μ M LDH	$1.1 \cdot 10^{-7}$	-150.7	-149.4	-154	- 49.1	+ 29
Bed. 4						
0.07 μ M FAD	$1.5 \cdot 10^{-8}$	-151	-149.7	-150.7	- 86.5	- 75
0.001 μ M FAD	$4.95 \cdot 10^{-10}$	-151	-149.9	-155.6	- 54	+ 73
Bed. 5						
2 μ M b ₅	$6.3 \cdot 10^{-8}$	-150.3	-149.5	-132.4	-100	- 28
0.5 μ M FAD						
2 μ M b ₅	$4.0 \cdot 10^{-8}$	-150.3	-149.5	-149.1	- 94	- 9
0.05 μ M FAD						
0.5 μ M b ₅	$1.4 \cdot 10^{-8}$	-150.4	-149.7	-153.3	-118	- 17,5
0.05 μ M FAD						

$$E_o(NAD) = - 310 \text{ mV}, \quad E_o(LN) = - 240 \text{ mV}$$

$$E_o(FAD) = - 108 \text{ mV}, \quad E_o(b_5) = - 31 \text{ mV}$$

Bed.1: 1 μ M LDH, 2 μ M FAD, 1 μ M NAD, $k_{20} = 0.2$

Bed.2: 1 μ M LDH, 0.05 μ M FAD, (0.1 mM NAD), 10 μ M b_5 , ($k_{21}=0.02$)

Bed.3: (1 μ M LDH), 0.05 μ M FAD, 1mM NAD, 10 μ M b_5 , $k_{21}=0.02$

Bed.4: 0.7 μ M b_5 , 0.2 mM NAD, 1 μ M LDH

Bed.5: 1 mM NAD, 1 μ M LDH.

Die Abweichung der Ist-Potentiale, errechnet aus den steady state-Konzentrationen und den Standard-Redox-Potentialen, vom Gleichgewichtspotential der anaeroben Titration, geben Aufschluss über das durch das Fließgleichgewicht erzeugte Gefälle des Potentials vom Redox-Puffer bis zum Indikator FAD bzw.

Cyt. b_5 .

Während das Potential der an LDH gebundenen Nukleotide nur Bruchteile eines Millivolts vom Gleichgewichtspotential verschieden ist, unterliegt das der freien Nukleotide grossen Schwankungen. Bei Vergrösserung der NAD-Konzentration wird die Abweichung vom Gleichgewicht des Nukleotid-Potentials grösser, die des Flavin- bzw. des Cyt. b_5 -Potentials kleiner, bei Vergrösserung der LDH-Konzentration wird die Abweichung des Potentials der beiden Glieder kleiner. Die Reduktase-Titration (2 μ M FAD) macht deutlich, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die LDH-Reaktion ist bei 0.1 μ M LDH/1mM NAD und bei 1 μ M LDH/10 mM NAD. Hier liegen trotz des geringen Flusses die Grenzen der Kapazität der LDH-Reaktion. Die gleichen Bedingungen liefern auch die relativ grössten Abweichungen des Nukleotidpotentials bei der Cyt. b_5 -Titration, nur sind die Abweichungswerte geringer wegen der 20-fach niedrigeren FAD-Konzentration. Hier verlagert sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur FAD-Reduktion, bei starker FAD-Erniedrigung zur Cyt. b_5 -Reduktion. Ausser im letzten Fall sind die Differenzen des Cyt. b_5 - und FAD-Potentials voneinander meist 70 - 80 mV in allen Bedingungen.

Das anaerobe Potential des Cyt.b₅ setzt sich nach 10 min (-60 mV) noch nicht völlig ins Gleichgewicht mit dem E_{L/P} (-151 mV). Allerdings beträgt der Wert der Konzentrationsdifferenz zum Gleichgewichtspotential nur noch 0.5 Promille der BRED-Konzentration, etwa $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ bei einer BRED-Veränderung, $1.5 \cdot 10^{-17} \text{ M/sec}$, d.h. völliges Gleichgewicht ist frühestens nach 10^8 sec zu erwarten.

4.3 Vergleich der experimentellen Titration mit der Simulation

4.3.1 b₅-Reduktase

Form der Titrationskurve

Experiment und Simulation zeigen übereinstimmend, dass beim Übergang anaerober zu aerober Titration und bei Vergrößerung der FAD-Konzentration die Titrationsgerade bei Auftragung $\log \text{ox/red}$ gegen E_{L/P} flacher wird und sich zum negativen Potential verschiebt. Verschiebt sich die Titrationskurve durch Veränderung der Flüsse noch weiter zum negativen Potential, so wird sie allmählich wieder steiler und linearer. Die Titrationskurve ist zum positiven Potential hin konkav gekrümmt, wobei die Krümmung in der Simulation etwa stärker ausgeprägt ist. Zieht man in dem Bereich $\log \text{ox/red} = +1$ bis -1 eine Regressionsgerade durch die Punkteschar, so ergibt sich im Experiment die Steigung 18 - 19 mV pro $\Delta \log \text{ox/red} = 1$ (0.4 μM) bis 13 mV (3 μM FAD), in der Simulation 15 - 20 mV (FAD 2 μM) bis 26 mV (0.05 μM FAD).

Abhängigkeit des E_a von den Konzentrationen

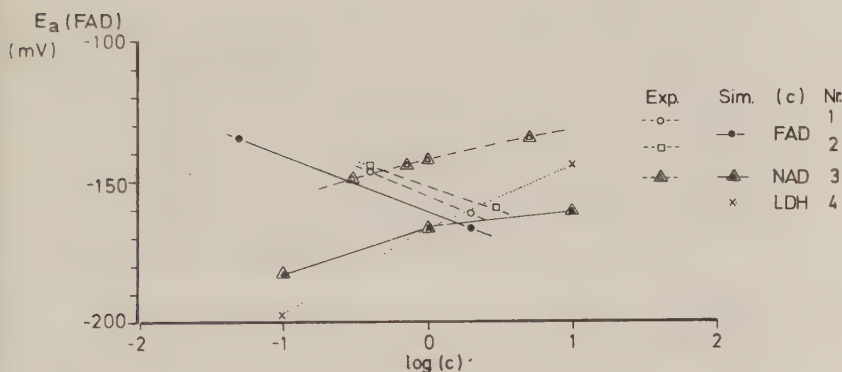


Abb. 76 Abhängigkeit des E_a (FAD) vom Logarithmus der Konzentrationen

Bedingungen

Nr.	Experiment	Simulation
1	1 μ M LDH, 0.7 mM NAD	1 μ M LDHG, 1 μ M NAD, $k_{20} = 0.2$
2	1 μ M MDH, 1 mM NAD	1 μ M LDH, 1 μ M FAD, $k_{20} = 0.2$
3	1 μ M LDH, 0.4 μ M FAD	1 μ M FAD, 1 mM NAD, $k_{20} = 0.2$

Die Verschiebung des scheinbaren Mittelpotentials E_a ist pro $\Delta \log[c] = 1$, also bei Verzehnfachung der jeweiligen Konzentration:

	Experiment	Simulation
NAD-Veränderung	12 mV (linear)	7 - 15 mV (nicht linear)
FAD-Veränderung	17 bzw. 21 mV	19 mV
LDH-Veränderung		31 bzw. 24 mV

Nimmt man an, dass sich MDH- und LDH-Reaktion kinetisch gleichartig verhalten und sich das E_a bei Veränderung der Konzentration einer Substanz (unter Beibehaltung einer beliebigen Kombination der Konzentrationen der anderen Substanzen) ungefähr gleichartig verschiebt, so können experimentelle und simulierte Daten zur Übereinstimmung gebracht werden. Hierbei muss der Übergang vom simulierten $k_{20} = 0.2$ auf $k_{20} = 0.1 \text{ sec}^{-1}$ des Experiment mit + 8 mV berücksichtigt werden.

Beispiel: Übergang von der experimentellen Titration 0.7 mM NAD, 0.4 μM FAD, 1 μM LDH, $k_{20} = 0.1$ ($E_a = -144 \text{ mV}$) auf die simulierte Titration 1 mM NAD, 2 μM FAD, 1 μM LDH, $k_{20} = 0.2 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$, ($E_a = -166 \text{ mV}$).

NAD: 0.7 - 1 mM: + 2 mV (exp.)
 FAD: 0.4 - 2 μM : - 15mV (exp.)
 k_{20} : 0.1 - 0.2 sec^{-1} : - 8 mV (simuliert)

Das scheinbare Mittelpotential liegt also bei - 144 - 21 = - 166 mV, was genau dem Wert der simulierten Kurve entspricht.

4.3.2

Cyt.b₅

Form der Titrationskurve

Experiment und Simulation zeigen übereinstimmend die in der Auftragung $\log \text{ox/red}$ gegen $E_{L/P}$ zum negativen Potential verschobene Titrationskurve des Cyt.b₅, die abgeflacht und zum positiven Potential hin gekrümmt ist. Die Krümmung ist in der Simulation stärker ausgeprägt. Zieht man im Bereich $\log \text{ox/red} = -1$ bis + 1 eine Regressionsgerade, so ergibt sich folgende Steigung pro $\Delta \log \text{ox/red} = 1$:

	Experiment	Simulation
FAD: 1 - 0.05 μ M	10 - 12 mV	8 - 12 mV
FAD: < 0.01 μ M	15 - 19 mV	15 - 20 mV
Mikrosomen	10 - 15 mV	

Titrationsskurve verschiebt sich bei Konzentrationsänderungen weitgehend ohne Veränderung ihrer Form, ausser bei starker Erniedrigung der Reduktase-Konzentrationen. Ist diese unter etwa 0.01 μ M, so wird die Regressionsgerade steiler, in der Simulation wird die Krümmung geringer und nähert sich einer Geraden.

Die Abhängigkeit des E_a von den Konzentrationen

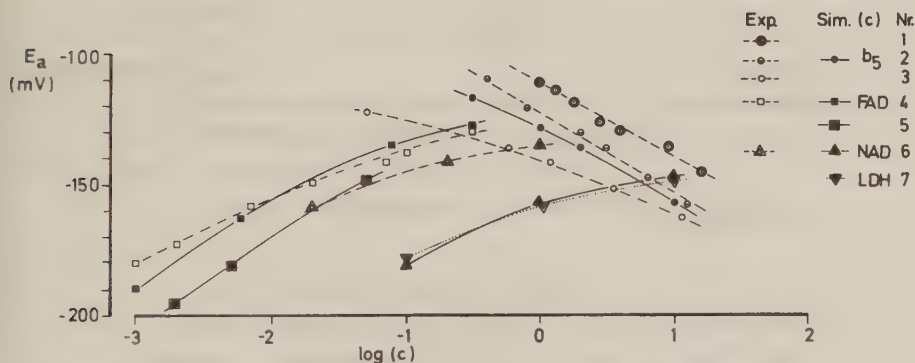


Abb. 77 Abhängigkeit des E_a (Cyt. b_5) vom Logarithmus der Konzentrationen

Bedingung

Nr.	Experiment	Simulation
1 (det- b_5)	2 μ M FAD, 2 μ M LDH, 0.2 mM NAD	
2 (det- b_5)	0.5 μ M FAD, 2 μ M LDH, 0.2 mM NAD	0.05 μ M FAD, 1 μ M LDH, 1 mM NAD
3 (try- b_5)	0.07 μ M FAD, 1 μ M LDH, 0.2 mM NAD	
4	0.7 μ M b_5 , 1 μ M LDH, 0.2 mM NAD	0.7 μ M b_5 , 0.2 mM NAD, 1 μ M LDH
5		10 μ M b_5 , 1 mM NAD, 1 μ M LDH
6	0.7 μ M b_5 , 1 μ M LDH, 0.07 μ M FAD	10 μ M b_5 , 0.05 μ M FAD, 1 μ M LDH
		10 μ M b_5 , 0.05 μ M FAD, 1 mM NAD

Die Abhängigkeit des $E_a(\text{Cyt.}b_5)$ von der FAD-Konzentration, die in einer Simulation unter den Konzentrationsbedingungen des Experimentes durchgeführt wurde, zeigt einen fast übereinstimmenden Verlauf.

In guter Näherung lassen sich die $E_a(\text{Cyt.}b_5)$ bei verschiedenen Konzentrationen in einander überführen: durch rechnerische Korrektur des Potentials.

Wegen der Diskrepanz der experimentellen und simulierten NAD-Abhängigkeit ergeben sich allerdings unterschiedliche Werte.

4.3.3

Anaerobe Reduktionskinetik

<u>Experiment</u>	Bedingung	Reduktions- geschwindigkeit	
		($\frac{\mu\text{M } b_5}{\text{min} \cdot 1 \cdot 10^{-10} \text{ M NADH}}$)	
Mikrosomen	$1\mu\text{M } b_5$, $2\mu\text{M MDH}$, $0.1\mu\text{M FAD}$	0.11	
Isoliertes $\text{Cyt.}b_5$	$1\mu\text{M } b_5$, $1\mu\text{M LDH}$, $0.02\mu\text{M FAD}$	0.115	- 0.15
	$1\mu\text{M } b_5$, $1\mu\text{M LDH}$, $0.04\mu\text{M FAD}$	0.225	- 0.335
<u>Simulation</u>	$1\mu\text{M } b_5$, $1\mu\text{M LDH}$, $0.05\mu\text{M FAD}$	0.225	

Die simulierte Reduktionsgeschwindigkeit des isolierten $\text{Cyt.}b_5$ ist also etwas geringer als die experimentell ermittelte. Das mikrosomale System hat bei entsprechender Extrapolation auf $1\mu\text{M}$ Dehydrogenase und $0.05\mu\text{M}$ FAD ein Viertel der simulierten Reduktionsgeschwindigkeit.

Die experimentelle und simulierte Reduktionsgeschwindigkeit des $\text{Cyt.}b_5$ ist bis zu einem Reduktionsgrad von etwa 90% linear, also 0. Ordnung.

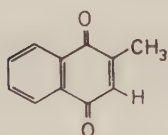
5 ZUR FUNKTION DES CYT. b_5 -SYSTEMS MIT PHYSIOLOGISCHEN UND XENOBIOTISCHEN SUBSTRATEN

5.1 Die Menadion-katalysierte Atmung

1970 stellten IYANAGI und YAMAZAKI (1970) die Reaktion der mikrosomalen NADH-Cyt. b_5 -Reduktase und der NADPH-Cyt.c-Reduktase mit p-Benzochinon fest. Im Gegensatz dazu sollte Menadion (Vit K_3) aber nur durch direkte Reaktion mit Cyt. b_5 und nicht mit Cyt. b_5 -Reduktase NADH oxidieren können. Die Reaktion des Menadion (MON) mit Sauerstoff und den reduzierenden Äquivalenten zu Menadiol (MOL) ist



Das entstandene Menadiol ist instabil und reagiert durch Autoxidation



Menadion

5.1.1 Mikrosomen

Der Sauerstoffverbrauch der Mikrosomen beträgt bei 5 mM NADH 6 - 9 nAtom O/min/mg Prot., diese Autoxidation wird bei Zusatz von Vit. K_3 (Menadion, MON) gesteigert, gleichzeitig sinkt der Redoxgrad von Cyt. b_5 .

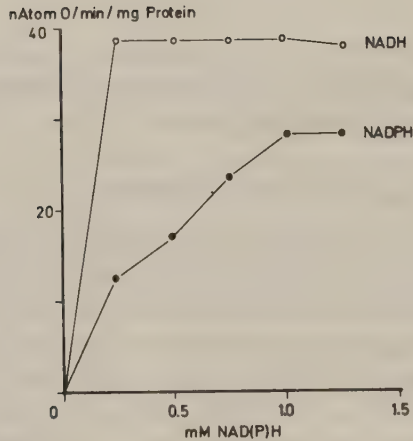


Abb. 78 Abhängigkeit der mikrosomalen Atmungsgrösse von der NAD(P)H-Konzentration, 250 μ M MON, 1 ml 0.1M TRAP pH 7.0, 25°C.

Während die Atmung schon bei 0.25 mM NADH maximal ist, steigt sie mit der NADPH-Konzentration langsamer an und erreicht erst bei 1 mM ein Maximum, das niedriger ist als mit NADH.

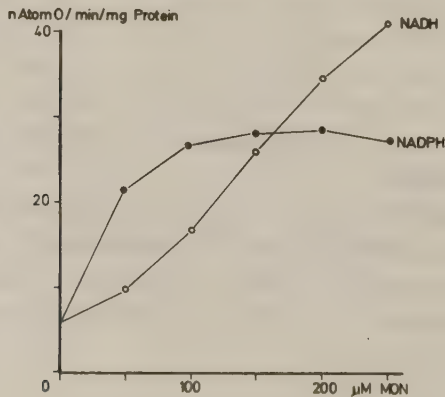


Abb. 79 Abhängigkeit der Atmungsgrösse von der MON-Konzentration. NAD(P)H 1 mM.

Bei Vergrößerung der MON-Konzentration steigt die Atmungsgrösse bei 1mM NADH linear an, während sich bei 1 mM NADPH eine Sättigungskurve zeigt, die nach schnellem Beginn eine Abflachung zum Maximalwert aufweist.

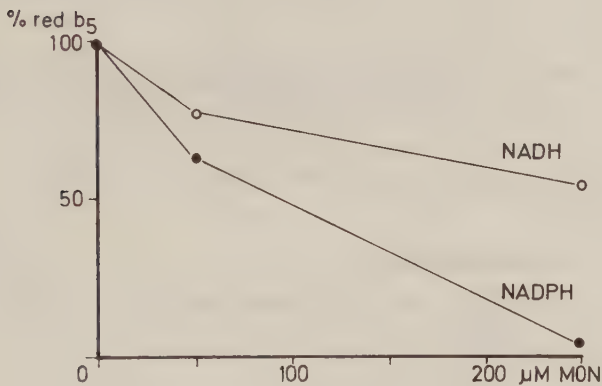


Abb. 80 Reduktionsgrad des mikrosomalen Cyt. b_5 in Abhängigkeit von der MON-Konzentration
Mikrosomen: 2.2 mg/ml, 1 mM NAD(P)H

Das nach NAD(P)H-Gabe reduzierte mikrosomale Cyt. b_5 wird durch MON oxidiert. Bei der Reaktion mit NADPH ist der Reduktionsgrad 95% (250 µM MON), während sie bei der NADH-Reaktion nur 55% beträgt.

5.1.2

lys-Reduktase

Die Reduktase zeigt qualitativ das gleiche Verhalten gegenüber NAD(P)H und MON wie die Mikrosomen. Der Sauerstoffverbrauch bei NADH-Zugabe ist schon bei 0.25 mM maximal mit 223 nAtom O/min/nMol Reduktase, während bei NADPH-Zugabe nur eine langsamere Steigerung eintritt und das Maximum erst bei 1 mM NADPH mit 165 nAtom O/min/nMol Reduktase erreicht wird.

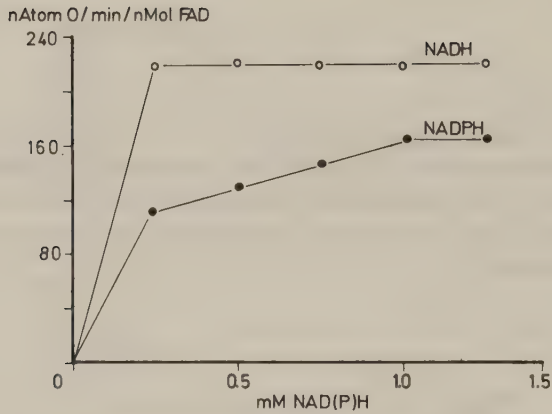


Abb. 81 Atmungsgrösse der lys-Reduktase in Abhängigkeit von der NAD(P)H-Konzentration
250 μ M MON

5.1.3 Isoliertes System lys-Reduktase + try- b_5

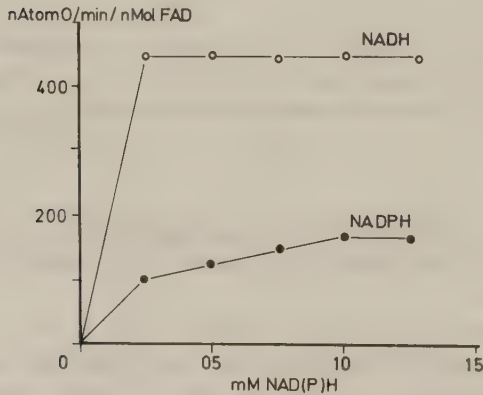


Abb. 82 0.03 nMol Reduktase, 0.25 nMol Cyt. b_5
1 ml 0.2 M TRAP pH 7.0, 25°C
Abhängigkeit der Atmungsgrösse von der
NAD(P)H-Konzentration

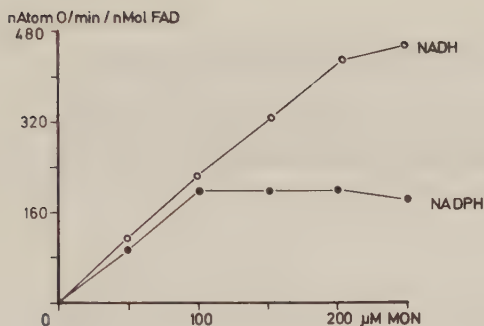


Abb. 83 0.03 nMol Reduktase, 0.25 nMol Cyt. b_5
1 ml TRAP, 0.1 M, pH 7.0, 25°C.
Abhängigkeit der Atmungsgrösse von der
Menadion-Konzentration

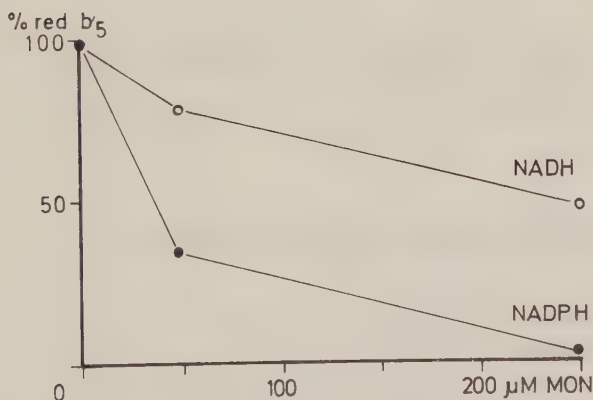


Abb. 84 Abhängigkeit des Reduktionsgrades von
Cyt. b_5 von der MON-Konzentration
0.25 μM b_5 , Reduktase 0.03 μM

Der Reduktionsgrad des Cyt. b_5 fällt also bei der
Reaktion mit NADPH trotz der geringeren Atmungsgrösse

schneller ab als bei der Reaktion mit NADH.

Die Atmungsgrösse bei Zugabe von 0.25 nMol b_5 zu 0.03 nMol Reduktase verdoppelt sich bei der NADH-Reaktion, bleibt aber bei der NADPH-Reaktion unverändert.

Die Konzentration von Reduktase (0.03 μ M) und Cyt. b_5 (0.25 μ M), sowie ihr Verhältnis zueinander in diesem isolierten System entsprechen etwa denen in 0.5 mg Mikrosomen pro ml. (Mikrosomen:Gehalt 0.5 nMol Cyt. b_5 /mg, 0.05 nMol Reduktase/mg). Daher sind die Werte der Atmungsgrössen und des b_5 -Reduktionsgrades bezogen auf nMol Reduktase vergleichbar:

	Reduktase	Reduktase + Cyt. b_5		Mikrosomen	
	a	a	b	a	b
<u>NADH</u>					
50 μ M MON		117	78.4%	88	76%
250 μ M MON	223	455	48.7	410	55
<u>NADPH</u>					
50 μ M MON		98	33	205	63
250 μ M MON	164	163	0	105	6

$$a = \frac{\text{nAtom O}}{\text{min} \cdot \text{nMol Reduktase}}$$

$$b = \text{Reduktionsgrad Cyt.}b_5(\%)$$

In den Systemen lys-Reduktase + try- b_5 zeigt sich bei der NADH-Reaktion ein Cyt. b_5 -Reduktionsgrad von 50%, sowie eine Verdoppelung der Atmungsgrösse gegenüber der Reduktase allein, während bei der NADPH-Reaktion keine Veränderung eintritt, das Cyt. b_5 aber zu 100% oxidiert ist. Die Mikrosomen sind dem lys-Reduktase/try- b_5 -System völlig vergleichbar: Die NADH-Reaktion

zeigt sehr ähnliche Atmungsgrößen bei fast gleichem Cyt. b_5 -Reduktionsgrad. Bei der NADPH-Reaktion ist in den Mikrosomen die Atmungsgröße schon bei 50 μ M MON maximal, während der b_5 -Reduktionsgrad mit 66% noch doppelt so hoch ist wie bei dem isolierten System, dessen Atmungsgröße erst halbmaximal ist.

Zugabe von Katalase

Wird am isolierten System während der Reaktion mit Menadion Katalase zugegeben, so wird sofort ein Teil des verbrauchten Sauerstoffs regeneriert. Nach Abzug des durch Autoxidation verbrauchten O_2 ergibt sich eine Regeneration von ca. 30%, die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt auf etwa 30 - 40% der anfänglichen.

Zugabe von Cyanid

Zugabe von 5 mM CN^- sowohl zum isolierten System wie auch zu Mikrosomen vermag die Reaktion mit Menadion nicht zu beeinflussen.

5.2

Die Peroxidase-Aktivität des Cyt. b_5 -Systems

Cyt. b_5 vermag ebenso wie das Flavin der Reduktase durch seine Autoxidation als NADH-Oxidase zu wirken. Das dabei entstehende H_2O_2 reagiert weiter zu H_2O (siehe 3.2.2.3), Cyt. b_5 hat in dieser Reaktion peroxidatische Funktion. Die Oxidation des NADH durch Cyt. b_5 steigt also in Gegenwart von Hydroperoxiden an. Untersucht wurde die Reaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), t-Butylhydroperoxid (BOOH) und Cumolhydroperoxid (COOH). Diese Substanzen sind in der aufgeführten Reihenfolge zunehmend lipophil.

5.2.1

Mikrosomen

Mikrosomen von nicht vorbehandelten Ratten

Die Mikrosomen wurden zur Entfernung von Katalase-Verunreinigungen zweimal in 0.1 M KCl gewaschen und zentrifugiert (80 000 g, 70 Minuten)

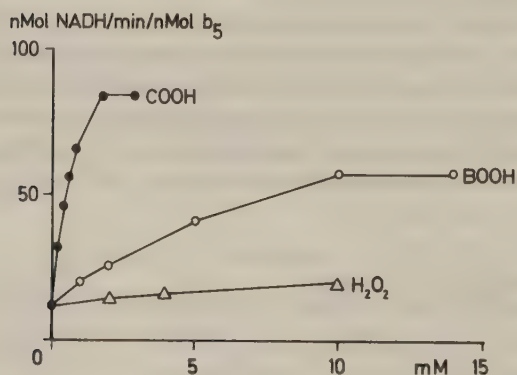


Abb. 85 NADH-Oxidation gemessen bei 366 nm, 0.2 mM NADH, 2 mG Mikrosomen (= 1 nMol Cyt.b₅, 0.9 nMol Cyt.P₄₅₀), 1 ml TRAP 0.1 M pH 7.0, 25°C.

Cumolperoxid als lipophilste Substanz steigert schon in Konzentrationen unter 1 mM die NADH-Oxidation um etwa das Zehnfache der Autoxidation. Die hydrophilere Substanz BOOH reagiert erheblich langsamer und benötigt zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit eine 8-fach höhere Konzentration. H₂O₂ reagiert nur in geringem Umfang und vergrößert in der Konzentration von 10 mM die NADH-Oxidation nur um 8 nMol/min/nMol Cyt.b₅. Der Reduktionsgrad des Cyt.b₅ liess sich schon mit 0.04 μ M Cumolperoxid auf 90% senken, er blieb dann dann aber konstant bei weiterer COOH-Erhöhung.

Mikrosomen von mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten

Durch die Luminalbehandlung (4 Tage 1 mg Phenobarbital/ml Trinkwasser) lässt sich die Konzentration an Cyt. P_{450} steigern. Die Mikrosomen enthielten 0.7 nMol Cyt. P_{450} /mg, also etwa 60% mehr als normal. Die NADH-Oxidation durch Cumolperoxid stieg um etwa den gleichen Prozentsatz von maximal 84 nMol NADH/min/nMol Cyt. b_5 auf 116 bei den Luminal-induzierten Mikrosomen. Butylperoxid zeigte eine etwas verminderte NADH-Oxidation, während die geringe Reaktion von H_2O_2 bei normalen und Luminal-induzierten Mikrosomen gleich blieb.

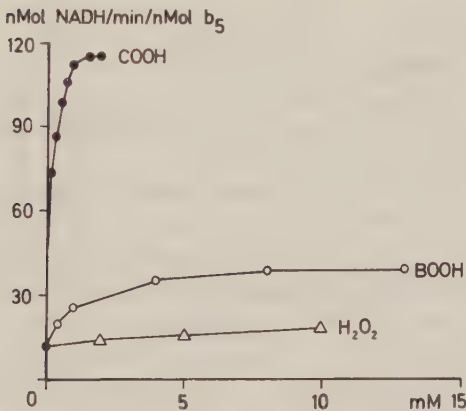


Abb. 86 NADH-Oxidation, gemessen bei 366 nm, 0.2 mM NADH, 2 mg Luminal-induzierte Mikrosomen (1 nMol Cyt. b_5 , 1.5 nMol Cyt. P_{450}), 1 ml TRAO 0.1 M pH 7.6, 25°C.

5.2.2 Isoliertes System try- b_5 + lys-Reduktase

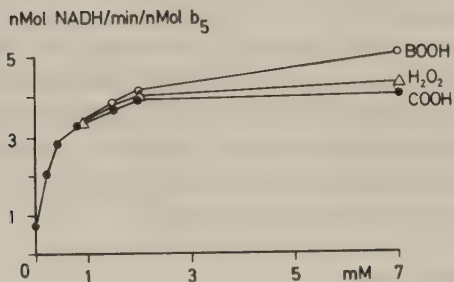


Abb. 87 NADH-Oxidation, 3 μ M Cyt. b_5 , 0.02 μ M Reduktase, 0.2 mM NADH, 1 ml 0.1 M TRAP pH 7.0, 25°C.

Das isolierte Cyt. b_5 -System vermag ebenfalls die Reduktion der Peroxide zu katalysieren. Der COOH-Umsatz auf Cyt. b_5 bezogen beträgt nur 10% der mikrosomalen COOH-Aktivität. Eine Bevorzugung eines Substrats aufgrund der Lipophilie lässt sich nicht feststellen. Alle drei Substrate reagieren in annähernd gleicher Geschwindigkeit, die dem mikrosomalen NADH-Umsatz des H_2O_2 entspricht. Der Autoxidationsfluss wird also in Gegenwart der Peroxide verfünffacht. Eine Erhöhung der Reduktase-Konzentration über 0.01 μ M hinaus führt zu keiner Erhöhung des NADH-Umsatzes, denn $1 \cdot 10^{-3}$ μ Mol Reduktase haben eine Cyt. b_5 -Reduktase-Aktivität von ca. 4 μ Mol/min.

Der steady-state Reduktionsgrad des Cyt. b_5 mit Sauer-

stoff und mit BOOH lässt sich in gleicher Weise senken durch Verminderung der Reduktase-Konzentration. Da das Peroxid den Fluss der Autoxidation etwa verfünffacht, sollte für den gleichen Cyt.b₅-Reduktionsgrad des Peroxidase-steady state eine etwa 5-fache Reduktase-Konzentration erforderlich sein gegenüber dem Autoxidations-steady state. Die Überlegung wird im Experiment belegt, vgl. Abb 89. Die Autoxidations- und die Peroxidase-Aktivität des Cyt.b₅ besitzen also die gleiche lineare Abhängigkeit vom Cyt.b₅-Reduktionsgrad.

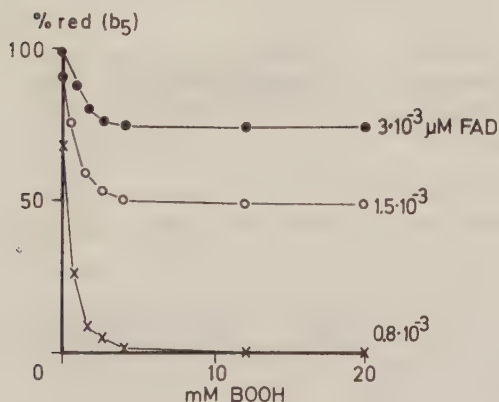


Abb. 88 3.5 μM Cyt.b₅, 0.2 mM NADH, 1 ml TRAP
pH 7.0 0.1 M, 25°C
Abhängigkeit des Reduktionsgrades des
Cyt.b₅ von der Reduktase- und BOOH-Kon-
zentration.

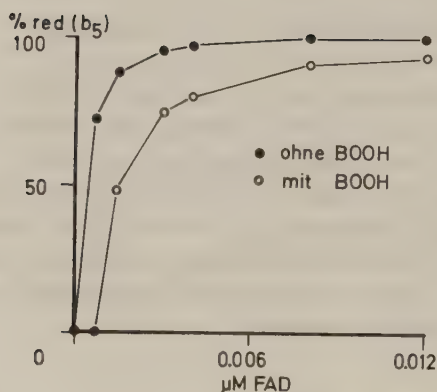


Abb. 89 12 mM BOOH, 3.5 μM Cyt.b₅, 0.2 mM NADH
Abhängigkeit des Reduktionsgrades des
Cyt.b₅ von der Reduktase-Konzentration
im Autoxidations- und im Peroxidase-steady
state

Bestimmt man aus der Peroxid-Konzentration bei halb-
maximaler Reaktionsgeschwindigkeit die ' K_M ', so er-
gibt sich

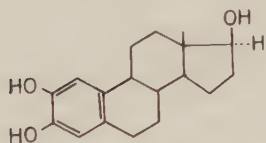
		' K_M ' (mM)	' v_{max} ' (nMol NADH/min/nMol b ₅)
<u>Mikrosomen</u>	COOH	0.3	85
	(nicht induziert)BOOH	2	40
	H ₂ O ₂	5	8
<u>isoliertes System</u>			
	COOH, BOOH, H ₂ O ₂	0.8	4

Die K_M des isolierten Systems (0.8 mM) errechnet sich
auch aus der BOOH-Konzentration bei halbmaximaler
Cyt.b₅-Oxidation.

5.3 Zur Reaktion des Cyt.b₅-Systems mit o-Diphenolen

5.3.1 2-Hydroxy-Östradiol

SCHEULEN (1975), sowie WOLLENBERG, SCHEULEN, BOLT, KAPPUS und REMMER (1976) fanden bei Inkubation von Rattenlebermikrosomen mit NADPH, DOPA, DOPAMIN und 2-Hydroxy-Östradiol in vitro eine Hemmung der Lipidperoxidation, eine Hemmung der Cyt.P₄₅₀-Reduktion und der Cyt.b₅-Reduktion, sowie eine irreversible Proteinbindung der Metaboliten dieser Katechole. Sie erklären dies durch Wechselwirkung verschiedener Oxidationsstufen der Katechole mit der NADPH-Cyt.c-Reduktase, sowie mit O₂⁻-Radikalen, deren Folge eine Entkopplung des mikrosomalen Elektronenflusses ist.



2-Hydroxy-Östradiol-17β

2-Hydroxy-Östradiol, das die NADPH-abhängige Reduktion des Cyt.b₅ in Mikrosomen zu hemmen vermag (P.WOLLENBERG et al.), steigert am isolierten Cyt.b₅-System den NADH- und Sauerstoff-Verbrauch. Der Autoxidationsfluss wird etwa verzehnfacht. Bei Verminderung der Konzentration der Reduktase zeigt sich die gleichzeitige Erniedrigung des Reduktionsgrades des Cyt.b₅, sowie des NADH-Verbrauchs. Die isolierte Reduktase ohne Cyt.b₅ erhöhte den NADH-Umsatz nicht.

Aus der Östradiol-Konzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit sowie bei halbmaximaler Cyt.b₅-Oxidation ergibt sich übereinstimmend eine 'K_M' von 0.02 mM.

Wird 2-Hydroxy-Östradiol zu einem NADH-regenerierenden System mit Lac/Pyr (1 μM LDH, 0.7 mM NAD, 0.2 μM Reduktase, 0.7 μM Cyt. b_5) zugegeben, so wird bei einem Verhältnis Lac/Pyr = 1 ($E_{L/P} = -180$ mV) der Reduktionsgrad des Cyt. b_5 von 100% auf 45% erniedrigt. In Mikrosomen lässt sich der Reduktionsgrad des Cyt. b_5 unter den gleichen Bedingungen von 70% auf 20% senken.

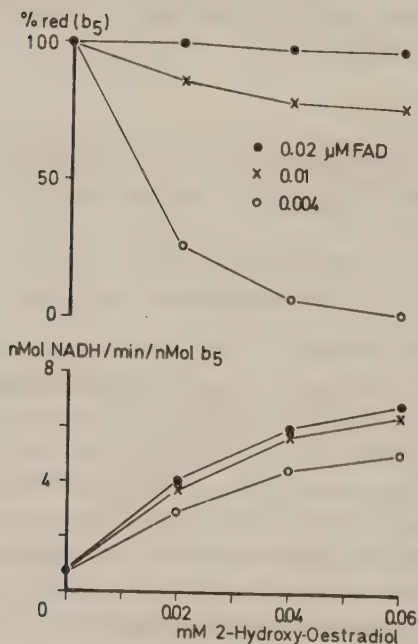
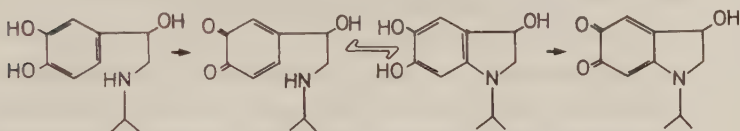


Abb. 90 Reduktionsgrad des Cyt. b_5 und NADH-Verbrauch bei Zugabe von 2-Hydroxy-Östradiol. 2.5 μM try-Cyt. b_5 , 0.5 mM NADH, 1 ml TRAP 0.2M pH 7.0, 25°C. lys-Reduktase 0.02, 0.01 und 0.004 μM .

5.3.2

Isoproterenol

Isoproterenol wird entweder in einem 2-Elektronen-Schritt direkt oder in zwei 1-Elektronenschritten über das Semichinon zum N-Isopropyl-Noradrenochinon oxidiert. Das Chinon kann reversibel zum N-Iso-propyl-Leukonoradrenochrom cyclisieren. Dieses Leukochrom reagiert wieder in einem 2-Elektronen-Schritt direkt oder in zwei 1-Elektronen-Schritten über das Semichinon zu N-Isopropyl-Noradrenochrom (NINAC).



Isoproterenol N-Isopropyl- N-Isopropyl- NINAC
Noradrenochinon Leuko-Noradre-
nochrom

Gegenüber den genannten Katecholen DOPA, DOPAMIN und 2-Hydroxy-Östradiol hat die Untersuchung des Isoproterenol-Metabolismus den Vorteil, dass das durch zweimalige Oxidation des Isoproterenol entstehende Produkt NINAC bei 485 nm mit $\epsilon = 2.8 \cdot 10^3$ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) gemessen werden kann (HEACOCK 1965),

5.3.2.1

Hemmung der mikrosomalen NADPH-Cyt. b_5 -Reaktion durch Isoproterenol

Zu Abb.91

2 Vergleichsexperimente

Rapidspektrophotometer, 2 mg Mikrosomen/ml

A) $\Delta Ext.$ 424 - 436 nm (Reduktionsgrad d.Cyt. b_5)

B) $\Delta Ext.$ 485 - 585 nm (Entstehung von NINAC)

Messküvette: 0.5 mM NADPH, 0.1 mM Isoproterenol

Reverenzküvette: NADPH ohne Isoproterenol

(siehe nächste Seite)

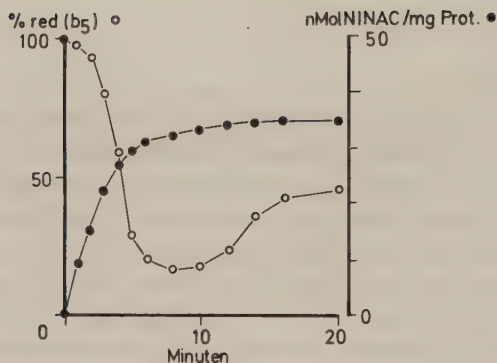


Abb. 91 Cyt.b₅-Oxidation und NINAC-Entstehung nach NADPH-Zugabe zu Mikrosomen

Das Maximum der Cyt.b₅-Oxidation liegt also nicht zur Zeit des grössten Flusses, in den ersten Minuten, sondern zum Zeitpunkt der maximalen Konzentration des Oxidationsproduktes NINAC.

5.3.2.2 Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch der Isoproterenol-Oxidation an Mikrosomen und isolierter NADPH-Cyt.c-Reduktase

a) aerob

Der Sauerstoff-Verbrauch und die Isoproterenol-Oxidation kommen zum Erliegen, wenn die eingesetzte NADPH-Menge verbraucht ist. Für die Oxidation von 1 Mol Isoproterenol zu 1 Mol NINAC werden 2 Mol O₂ und 2 Mol NADPH gebraucht. Da diese Oxidation wegen der Zyklisierung des primär entstehenden N-Isopropyl-Noradrenochinons einer zweimaligen Oxidation eines Katechols zu einem Chinon entspricht, bedeutet dies allgemein für die Oxidation von 1 Mol Katechol zu 1 Mol Chinon den Verbrauch von 1 Mol O₂ und 1 Mol NADPH.

Zugabe von Katalase beeinflusst die Stöchiometrie nicht, jedoch wird die Geschwindigkeit der Isoproterenol-Oxidation herabgesetzt.

	$\frac{\text{nMol NADPH}}{\text{nMol NINAC}}$	$\frac{\text{nMol NINAC}}{\text{min}}$	$\frac{\text{nMol O}_2}{\text{nMol NINAC}}$	$\frac{\text{nMol O}_2}{\text{min}}$
<u>Mikrosomen</u>				
ohne Katalase	1.85	+ 16.2	1.9	- 31.5
mit Katalase	1.80	+ 11.6	1.85	- 19.0
<u>NADPH-Cyt.c-Red.</u>				
ohne Katalase	1.95	+ 11.2	1.95	- 20.1
mit Katalase	2.05	+ 6.9	2.10	- 14.2

(Die Maximalgeschwindigkeiten beziehen sich auf 1 mg Mikrosomen, bzw. 0.06 U NADPH-Cyt.c-Reduktase)

b) Anaerob

Wird nach NINAC-Entstehung der Luftsauerstoff der Kuvette mit Hilfe von Glucose-Oxidase, Glucose und Katalase entfernt, so lässt sich durch NADPH-Zugabe das Oxidationsprodukt wieder reduzieren.

Die Stöchiometrie ist

Mikrosomen 1.9 nMol NADPH/nMol NINAC
 NADPH-Cyt.c-Reduktase 2.05 nMol NADPH/nMol NINAC

Die zu Isoproterenol zurückführende Reaktion verbraucht also 2 Mol NADPH pro Mol entstehenden Isoproterenol, was entsprechend der obigen Überlegung die Reduktion eines Mols Chinon durch 1 Mol NADPH bedeutet.

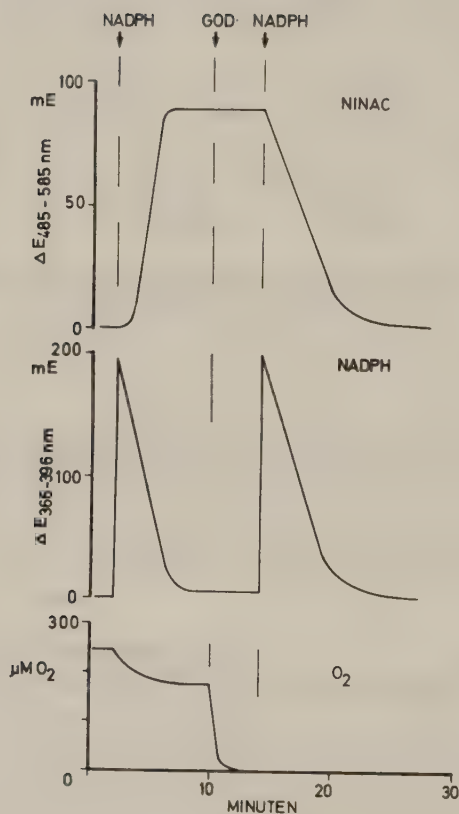


Abb. 92 Vergleichsexperimente zur Messung der Stöchiometrie NADPH: O_2 :Isoproterenol. 1 ml TRAP, pH 7.0, 25°C, 0.07 U NADPH-Cyt.c-Reduktase, Isoproterenol 0.25 mM
Zugabe: NADPH: 60 μM
GOD: GOD, Glucose, Katalase

5.3.2.3 Die Reaktion des isolierten Cyt. b_5 mit Isoproterenol

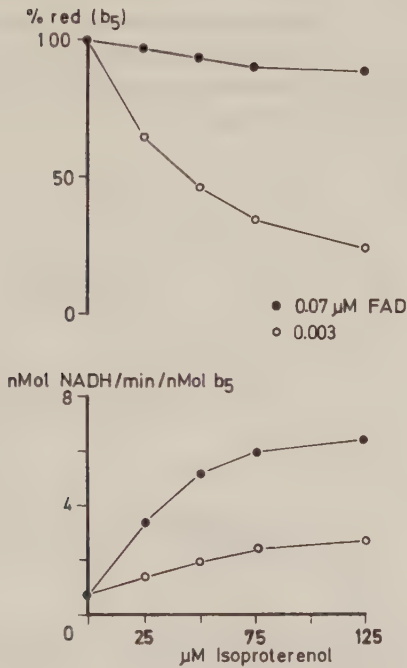


Abb. 93: $3 \mu\text{M}$ Cyt. b_5 , 0.5 mM NADH
Reduktionsgrad des Cyt. b_5 und NADH-Verbrauch
in Abhängigkeit von der Isoproterenol-Kon-
zentration.

Das isolierte Cyt. b_5 -System vermag Isoproterenol nicht zu NINAC zu oxidieren, eine Zunahme der Extinktion bei 485 nm wird nicht beobachtet. Trotzdem wird das isolierte Cyt. b_5 bei Isoproterenol-Zusatz oxidiert. Der Reduktionsgrad des Cyt. b_5 sinkt je nach Reduktase-Konzentration in Abhängigkeit von der Isoproterenol-Konzentration. Ebenso steigt der Sauerstoff- und NADH-Verbrauch an. V_{max} ist etwa $6 \text{ nMol NADH/min/nMol } b_5$, die K_M zu Isoproterenol ergibt sich aus dem halbmaximalen NADH-Verbrauch und halbmaximaler b_5 -Oxidation zu $30 - 50 \text{ mM}$. Die isolierte Cyt. b_5 -Reduktase ohne Cyt. b_5 vermag den Autoxidationsfluss nach Isoproterenol-Zugabe nur um etwa 30% zu steigern.

- 5.3.2.4 Die Hemmung der NADPH-abhängigen Isoproterenol-Oxidation durch Cyt.b₅
 Die Zugabe von Cyt.b₅-Reduktase, Cyt.b₅ und NADH, in geringerem Umfang auch die von Cyt.b₅-Reduktase allein, vermag die Isoproterenol-Oxidation des NADPH-Cyt.c-Reduktase-Systems zu hemmen.

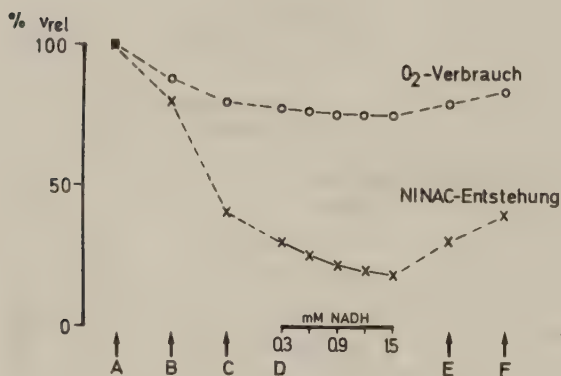


Abb. 94 Hemmung der Geschwindigkeit der Isoproterenol-Oxidation. v_{rel} = relative Geschwindigkeit der Isoproterenol-Oxidation und des O₂-Verbrauchs (100% = v_{max})

- A: isolierte NADPH-Cyt.c-Reduktase
 (0.07 U NADPH-Cyt.c-Reduktase-Aktivität)
 0.2 mM NADPH, 0.2 μ M Isoproterenol
 B: + 0.2 μ M Cyt.b₅-Reduktase
 C: + 3 μ M Cyt.b₅
 D: NADH-Zugabe
 E: + 0.07 U NADPH-Cyt.c-Reduktase/ml
 F: + 0.5 mM NADPH

Die Hemmung nach Zugabe von Cyt.b₅-Reduktase und Cyt.b₅ ohne NADH beruht auf der geringen Reaktion der isolierten lys-Reduktase mit NADPH. Während die Geschwindigkeit der NINAC-Entstehung nach NADH-Zugabe

bis auf 18% gesenkt wird, ist die Auswirkung der Hemmung durch das Cyt. b_5 -System auf den Sauerstoff-Verbrauch weniger ausgeprägt. Die Hemmung des O_2 -Verbrauchs und der NINAC-Entstehung ist durch Erhöhung der NADPH-Cyt.c-Reduktase- und NADPH-Konzentration zum Teil aufhebbar. Die pro eingesetzte Isoproterenol-Menge entstandene NINAC-Konzentration wird durch das Cyt. b_5 -System selbst nicht verändert, die Ausbeute an Oxidations-Produkt ist am Reaktionsende gleich. Die Stöchiometrie NADPH/NINAC ist vergrößert je nach eingesetzter Konzentration der Elemente des Cyt. b_5 -Systems. Es wird also mehr NADPH verbraucht. In Anoxie kann das entstandene NINAC nicht nur durch NADPH (siehe oben), sondern auch nach Zugabe des isolierten Cyt. b_5 -Systems mit NADH reduziert werden. Die Reduktionsgeschwindigkeit ist aber mit ca. 2 nMol NADH/min/nMol b_5 nur 10 - 25% der Reduktionsgeschwindigkeit im NADPH-System. Aus diesem Experiment geht auch hervor, dass im Gegensatz zum mikrosomalen System im isolierten Cyt. b_5 -System + NADPH-Cyt.c-Reduktase keine Elektronen von der Cyt. b_5 -Reduktase auf die Cyt. P_{450} -Reduktase übergehen.

6 DISKUSSION

6.1 Das Mittelpotential des isolierten Cyt.b₅

6.1.1 Das 'wahre Mittelpotential' E'_o

STRITTMATTER und VELICK 1956 fanden durch Gleichgewichtsmessung mit Redoxpartnern bekannten Potentials (in anaerober Küvette, Titration mit Dithionit und Ferricyanid, pH 6.9, 26° C) für das freie isolierte try-Cyt.b₅ mit E'_o = + 9 mV ein um 150 mV positiveres Potential als für das gebundene und ziehen eine unterschiedliche Bindung des reduzierten bzw. oxidierten Cytochroms in der mikrosomalen Membran an die Reduktase in Betracht. STRITTMATTER (1961) diskutiert eine Differenz des Mittelpotentials zwischen gebundenem (E'_o = - 120 mV) und freiem Cyt.b₅ (E'_o = +20 mV). KAWAI, YONEIMA und YOSHIKAWA (1963) bestimmten das Mittelpotential von Cyt.b₅ in Mikrosomen auf - 140 mV. WEBER, WEISS und STAUDINGER (1971) stellten ein Mittelpotential des Cyt.b₅ in mikrosomalen Membranen und isoliert von + 24 mV fest mit Hilfe von Ascorbat. WOLLENBERG und KRÄMER (1974) bestimmten das Mittelpotential des tryptisin-isolierten und mikrosomalen Cyt.b₅ auf - 240 mV.

Wir finden in Anoxie durch Titration mit Dithionit an der Platinelektrode ein Mittelpotential des isolierten Cyt.b₅ von E'_o = + 6 mV, n = 1. Bei anaerober L/P-Titration ist das mikrosomale und isolierte Cyt.b₅ bei E = - 80 mV voll reduziert. Bedingt durch die kleine Michaeliskonstante zu Sauerstoff (K_M = 7 μM O₂) genügen schon geringe Luftverunreinigungen während der Messung um durch den Autoxidations-steady state erheblich negativere 'scheinbare Mittelpotentiale' zu erhalten. Dies kann die Ursache darstellen für die in den früheren Arbeiten berichteten Mittelpotentiale < 0 mV.

6.1.2

Das 'scheinbare Mittelpotential'

Bei der aeroben L/P-Titration lässt sich ein scheinbares Mittelpotential E_a messen, das um 100 - 200 mV negativer ist als das wahre Mittelpotential E_o . Dieses E_a hängt sehr empfindlich von der Reduktase- und der Cyt. b_5 -Konzentration ab. Dies kann zur Annahme führen, dass durch verschiedene Dissoziationskonstanten des reduzierten und oxidierten Cytochroms zur Reduktase ein verschiedenes Mittelpotential des freien und des an Reduktase gebundenen Cyt. b_5 bedingt wird, wie dies auch von STRITTMATTER (1956 und 1961) vermutet wurde. Danach sollte sich aus den eingesetzten Konzentrationen und dem E_a die Dissoziationskonstanten und die Mittelpotentiale errechnen lassen Es ist:

ob: Konzentration des gebundenen, oxidierten Cyt. b_5

rb: Konzentration des gebundenen, reduzierten Cyt. b_5

of: Konzentration des freien, oxidierten Cyt. b_5

rf: Konzentration des freien, reduzierten Cyt. b_5

E_{OB} und E_{of} sind die unterschiedlichen Mittelpotentiale des gebundenen und des freien Cyt. b_5 .

$$E_1 = E_{ob} + a \cdot \log \frac{ob}{rb}$$

$$E_2 = E_{of} + a \cdot \log \frac{of}{rf}$$

Im Gleichgewicht ist $E_1 = E_2 = E$

$$K_{DO} = \frac{E_{frei} \cdot of}{ob} = C \text{ (Dissoziationskonstante des oxidierten Cyt.} b_5 \text{)}$$

$$K_{Dr} = \frac{E_{frei} \cdot rf}{rb} = D \text{ (Dissoziationskonstante des reduzierten Cyt.} b_5 \text{)}$$

E_{frei} = Konzentration der freien Reduktase

$$\frac{of}{rf} = \frac{C}{D} \cdot \frac{ob}{rb}$$

$$E_{of} - E_{ob} = a \cdot \log\left(\frac{D}{C}\right) \quad Q = \frac{C}{D}$$

Gemessen wird bei der Titration E_a dort, wo die Hälfte des Cyt. b_5 reduziert vorliegt, wobei photo-metrisch nicht zwischen freiem und gebundenen Cyt. b_5 unterschieden werden kann:

$$of + ob = \left[\frac{1}{2}b_5\right] = B$$

$B = 50\%$ der eingesetzten b_5 -Konzentration.

$$rf + rb = B = of + ob$$

Die Enzymkonzentration ist

$$K = ob + rb + E_{frei}$$

$$E_{frei} = D \cdot \frac{rb}{rf}$$

Aus diesen Gleichungen ergibt sich für die Konzentration des gebundenen oxidierten und reduzierten Cyt. b_5 am Punkt 50%iger Reduktion (E_a):

$$rb = B - \frac{D \cdot rb}{K - ob - rb} \quad rb = \frac{Q \cdot ob \cdot B}{B - ob + Q \cdot ob}$$

$$rb_{1/2} = -1/2(ab - k - B - D) \pm \sqrt{1/4(ob-K-B-D)^2 + B \cdot ob - B \cdot K}$$

$$k_1 \cdot ob^3 + k_2 \cdot ob^2 + k_3 \cdot ob + k_4 = 0$$

$$k_1 = Q - 1$$

$$k_2 = C - QK - Q^2D + 2B + K$$

$$k_3 = BKQ - B^2Q - BC - B^2 - 2BK$$

$$k_4 = B^2K$$

So lassen sich bei Messung der Abhängigkeit des E_a von der Cyt. b_5 -Konzentration die Parameter E_{ob} , E_{of} , K_{Do} und K_{Dr} errechnen.

Die Titrationsgleichung selbst lautet mit den so bestimmten Konstanten

$$E = E_{ob} + a \cdot \log \frac{ob + of}{rb + rf}$$

$$rb = A - \sqrt{A^2 - \frac{B \cdot K}{2(F + 1)}}$$

$$A = \frac{B + D + K + F(C + B + K)}{2(F + 1)^2}$$

$$F = e^{\frac{2 \cdot 3}{a} (E - E_{ob})}$$

$$ob = rb \cdot F$$

$$rb = \frac{D \cdot rb}{K - ob} - rb$$

$$ob = B - ob - rf - rb$$

Die einzelne Titrationskurve lässt sich auf diese Weise mit $a = 10$ mV berechnen.

Zur Erklärung der flachen Steigung der Cyt. b_5 -Titrationskurve muss zusätzlich angenommen werden, dass Cyt. b_5 in wässriger Lösung polymerisiert, wie es für das det- b_5 nachgewiesen wurde. Das Cyt. b_5 sollte ein Aggregat von 5 - 6 Molekülen bilden und einen kooperativen Effekt zeigen, d.h. erleichterte Reduktion eines Aggregats bei Reduktion eines Moleküls Cyt. b_5 daraus. Dieser kooperative Effekt könnte den Übergang der Steigung der Titrationskurve von 59 mV auf $10 - 14 \text{ mV} / \Delta \log \frac{ox}{red} = 1$ erklären. Die Rechnung zeigt, dass die Abhängigkeit des E_a von der Cyt. b_5 -Konzentration in guter Näherung wiedergegeben werden kann, wenn $a = 59$ mV gesetzt wird.

Die Werte sind dann für das System 2 μM det-Reduktase/det- b_5 :

$$K = 1.9 \mu\text{M}, a = 59 \text{ mV}, C = 3.5 \mu\text{M}, D = 0.3 \mu\text{M}, \\ E_{\text{ob}} = -125 \text{ mV}, E_{\text{of}} = -210 \text{ mV}.$$

und für das System 0.5 μM det-Reduktase/det- b_5 :

$$K = 0.5 \mu\text{M}, C = 3.5 \mu\text{M}, D = 0.1 \mu\text{M}, E_{\text{ob}} = -113 \text{ mV} \\ E_{\text{of}} = -210 \text{ mV}$$

Das Modell ist aber nicht stimmig, da für diese Konstantenrechnung $a = 59 \text{ mV}$ ($n = 1$) gesetzt werden muss, um Experiment und Rechnung zur Übereinstimmung zu bringen. Die Errechnung der einzelnen Titrationskurve erfordert jedoch einen Wert von $a = 10 - 14 \text{ mV}$. Darüberhinaus kann die NAD- und LDH-Abhängigkeit der Cyt. b_5 -Titration durch dieses Modell nicht erklärt werden, sondern nur durch zusätzliche Annahmen.

6.2

Mittelpotential der Cyt. b_5 -Reduktase

IYANAGI, MAKINO, MASON (1974) bestimmten das Mittelpotential der lys-Reduktase mit Ferricyanid und Dithionit auf $E'_0 = -280 \text{ mV}$.

STRITTMATTER und VELICK (1957) konnten die lys-Reduktase mit NADH nicht völlig reduzieren und schätzten deshalb das Mittelpotential nach Titration mit NADH und Ferricyanid auf -250 bis -350 mV .

DIXON (1971) nennt die Messung der Redoxpotentiale an Flavoproteinen widersprüchlich und hält für die beste Messung die von VESTLING an der NADPH-Dehydrogenase mit $E_0 = -70 \text{ mV}$. Das Potential der meisten Flavoproteine soll danach erheblich negativer sein als die der freien Flavine.

Wir finden durch Redoxtitration mit Lactat/Pyruvat in Anoxie ein Mittelpotential der lys-Reduktase von $E'_0 = -108 \text{ mV}$, $n = 2$. Etwa 5 - 10% des Flavins der lys-Reduktase liess sich wohl durch Dithionit, nicht aber durch NADH reduzieren. Dieser Anteil blieb aber auch nach Zugabe einer hohen Konzentration NAD konstant und ist also nicht potentialabhängig. Der nach Abzug dieses enzymatisch inaktiven Flavins verbleibende Anteil (90 - 95%) liess sich mit NADH auch in Gegenwart von NAD voll reduzieren. Eine Erniedrigung des Mittelpotentials durch einen Autoxidations-steady-state analog dem des Cyt.b₅, bedingt durch die hohe Affinität zu Sauerstoff ($K_M = 11 \mu\text{M}$), ist für das berichtete E'_0 von -280 mV in Betracht zu ziehen. Andererseits lässt es sich nicht ausschliessen, dass sich durch die Gegenwart von gebundenem Substrat (NAD, NADH) das Mittelpotential von -280 auf -108 mV verschiebt. Dieses Verhalten wäre analog zu dem des Cyt.P₄₅₀-Mittelpotential, das nach Zugabe von Substrat ein um 150 mV positiveres Redoxpotential aufweist (WATERMAN, MASON 1972), (SCHLEYER, COOPER, ROSENTHAL 1973).

Bei der NADPH-Cyt.c-Reduktase, die ein O_2 -stabiles Semichinon bildet, wird für das Mittelpotential $F + H^+ = FH^+$, $E'_0 = -109 \text{ mV}$ gemessen (IYANAGI, MAKINO und MASON 1974). Allerdings ist bei der NADH-Cyt.b₅-Reduktase kein Semichinon im Spektrum nachweisbar.

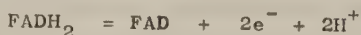
6.3

pH-Abhängigkeit von E_a und E_o

Die pH-Abhängigkeit des scheinbaren Mittelpotentials E_o der Reduktase (aerob) von 33 mV/pH beruht auf

der Kombination der pH-Abhängigkeit des wahren Mittelpotentials der Reduktase mit der pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität (Reduktionsgeschwindigkeit). Für das Cyt.b₅ gilt das gleiche.

Die pH-Abhängigkeit des wahren Mittelpotentials E₀ des Flavoproteine ist verschieden von der des freien Flavins. Die pH-Abhängigkeit des freien Flavins ist nach



- 59 mV/pH, d.h. FAD wird umso leichter reduziert, je saurer der pH ist.

Die pH-Abhängigkeit des Mittelpotentials im Flavoprotein, nämlich bei pH < 7 gleich Null, pH > 7 gleich - 59 mV/pH, zeigt, dass im Flavoprotein eine Gruppe dem Flavin benachbart ist, die beim Übergang vom oxidierten zum reduzierten Zustand zwei Protonen verstärkt abdissoziiert. Bei pH < 7 ist also



wobei aber die Protonen im sauren pH abdissoziieren sollten, nicht aber im basischen. Dieses eigenartige Verhalten kann nicht erklärt werden.

6.4

Die scheinbaren Mittelpotentiale des isolierten Cyt.b₅-Systems im Vergleich zu den Mikrosomen

Das scheinbare Mittelpotential des mikrosomalen Cyt.b₅ ist - 175 mV (Bedingung: 4 mg Mikrosomen/ml = 2 μM Cyt.b₅/0.2 μM Reduktase, 3 μM LDH, 0.7 mM NAD)

In Detergens verschiebt sich das Mittelpotential auf - 182 mV, nach Stickstoffbegasung auf - 150 mV. Die Begasung vermindert die O_2 -Konzentration auf einen Wert in der Größenordnung der Michaelis-konstante zu Sauerstoff. Der Autoxidationsfluss wird geringer und das scheinbare Mittelpotential etwas positiver. Der Effekt des Detergenszusatzes ist dadurch zu erklären, dass die Solubilisierung der mikrosomalen Membran ('Pseudolösung') in von Detergens umgebenen Micellen die Interaktion der Reduktase mit dem Cyt. b_5 beeinträchtigt, also die Reduktionsgeschwindigkeit herabsetzt. Detergens bewirkt die gleiche Potentialverschiebung auch am hydrophoben System det-Reduktase/det-Cyt. b_5 , nicht aber am System lys-Reduktase/try-Cyt. b_5 . Nach ROGERS und STRITTMATTER (1973) ist das Cyt. b_5 in der Lipidphase der Mikrosomenmembran statistisch verteilt und reagiert regellos mit den in 10-fach geringerer Konzentration vorhandenen Reduktasemolekülen. Eine Redoxtitration des isolierten det-Cyt. b_5 -Systems unter gleichen Konzentrationsbedingungen wie in Mikrosomen läge bei etwa $E_a = - 135$ mV, wie sich durch die experimentellen Konzentrationsabhängigkeiten des E_a herleiten lässt. Die Differenz zum mikrosomalen System beträgt also +40 mV. Dies lässt auf einen im Autoxidations-steady state entweder erniedrigten Zufluss oder erhöhten Abfluss reduzierender Äquivalente im mikrosomalen System schliessen. Tatsächlich lässt sich mit mikrosomalen Cyt. b_5 unter anaeroben Bedingungen auch nur 1/4 der Reduktionsgeschwindigkeit des isolierten Cyt. b_5 messen (auf vergleichbare Konzentrationen extrapoliert, siehe 4.3.2.5). Die NADH-Ferricyanid-Reduktase-Aktivität des mikrosomalen Enzyms ist jedoch gleich der des isolierten und bei beiden erheblich höher als die Cyt. b_5 -Reduktase-Aktivität. Daher muss die Verminderung der anaeroben Cyt. b_5 -Reduktionsgeschwindigkeit auf einer Verschiebung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes in der

mikrosomalen Membran von der Flavinreduktion zur Cyt. b_5 -Reduktion beruhen. Hinzu kommt für die aerobe L/P-Titration, dass in Mikrosomen der Autoxidationsfluss wegen des Übergangs reduzierender Äquivalente auf die ebenfalls autoxidablen NADPH-Cyt.c-Reduktase und Cyt. P_{450} erheblich grösser ist als im isolierten System. Dadurch verschiebt sich das Potentialgefälle und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion weiter zur Cyt. b_5 -Reduktion. ROGERS und STRITTMATTER (1973), geben an, dass in Mikrosomen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Reoxidation der Reduktase mit Cyt. b_5 ist und bei Benutzung von Pyridinnukleotidderivaten die Reduktion des Flavins langsamer wird, so dass die Reduktionsgeschwindigkeit des Cyt. b_5 dann von der des Flavins abhängt. Demgegenüber soll bei dem gereinigten Enzym in Lösung die Reduktase-Reduktion geschwindigkeitsbestimmend sein. Diese Befunde stimmen also mit den obigen überein.

6.5

Die Form der aeroben Titrationskurve

Die Reduktionsgeschwindigkeit von Reduktase und Cyt.b₅ ist linear abhängig von der NADH-Konzentration. Es gilt also

$$v_{\text{red}} = a \cdot [\text{NADH}]$$

bis etwa $[\text{NADH}] = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M.}$

Die NADH-Konzentration steigt mindestens bis zu einem Potential von 59 mV positiver als das NAD-Mittelpotential exponentiell mit dem $E_{\text{L/P}}$ an, da die gleichzeitige NAD-Änderung (bis 1%) vernachlässigt werden kann. Es gilt also bis etwa - 260 mV

$$[\text{NADH}] = a \cdot 10^{-\frac{E_{\text{L/P}} - E_{\text{O}}(\text{NAD})}{29}} \quad (a = [\text{NAD}] \cdot 10^{\frac{E_{\text{O}}(\text{NAD})}{29}}).$$

Die Autoxidationsgeschwindigkeit ist linear von der Konzentration an reduziertem Substrat, d.h. bei konstanter Gesamtkonzentration vom Reduktionsgrad abhängig. Es gilt

$$v_{\text{ox}} = k \cdot [\text{red}]$$

Der Reduktionsgrad (Flavin bzw. Cyt.b₅) ist vom Potential abhängig nach

$$\frac{[\text{red}]}{[\text{ox}] + [\text{red}]} = \frac{10^{\frac{(E_{\text{L/P}} - E_{\text{O}}) \cdot n}{59}}}{1 + 10^{\frac{(E_{\text{L/P}} - E_{\text{O}}) \cdot n}{59}}}$$

Er ist also nur bis zu mindestens 30 mV positiverem $E_{\text{L/P}}$ als E_{O} (FAD bzw. Cyt.b₅) exponentiell von $E_{\text{L/P}}$ abhängig, ab einem 30 mV negativerem $E_{\text{L/P}}$ als E_{O} wird die Änderung des Reduktionsgrades immer geringer. Dieses Verhalten findet im sigmoiden Verlauf der Titrationskurve bei linearer Auftragung des Reduktions-

grades gegen das Potential seine Darstellung. In dem Bereich des L/P-Potentials, in dem sowohl der anaerobe Reduktionsgrad, damit auch die Autoxidationsgeschwindigkeit, als auch die Reduktionsgeschwindigkeit exponentiell von $E_{L/P}$ abhängen, ist - als Ergebnis beider exponentieller Abhängigkeiten - der aerobe Reduktionsgrad linear vom L/P-Potential abhängig. Dies trifft also zu bei einem grossen Wert $\log \text{ox/red}$ (FAD bzw. Cyt. b_5), d.h. bei kleinem Reduktionsgrad. Hier steigt also der aerobe Reduktionsgrad im Gegensatz zur anaeroben Titration erst bei negativerem $E_{L/P}$ -Potential an, und zwar langsamer und linear. In dem Bereich, in dem die Erhöhung des L/P-Quotienten zwar weiter eine exponentielle Erhöhung der Reduktionsgeschwindigkeit, aber eine sehr viel geringere Erhöhung des Reduktionsgrades und damit der Oxidationsgeschwindigkeit bewirkt (ab ca. 25% red), ist dann der Reduktionsgrad nicht mehr linear vom Potential abhängig. Er steigt nun wegen des immer mehr überwiegenden Zuflusses reduzierender Äquivalente gegenüber dem Abfluss umso rascher an, je negativer das Potential ist. Dieses Verhalten der aeroben Titrationsskurve bewirkt in der linearen Auftragung des Reduktionsgrades gegen $E_{L/P}$ eine zum negativen Potential hin verschobene, unsymmetrisch sigmoide Titrationsskurve, deren Wendepunkt bei einem höheren Reduktionsgrad liegt, als der der aeroben. In der graphischen Auftragung $\log \text{ox/red}$ gegen $E_{L/P}$ wird aus der Geraden der anaeroben Redoxtitration eine zum negativen Potential verschobene, zum positiven Potential hin konkave Kurve, die mit negativerem $E_{L/P}$ immer flacher verläuft. Ist aber die Reduktionsgeschwindigkeit ab einer bestimmten NADH-Konzentration nicht mehr linear von $[\text{NADH}]$, also exponentiell vom Potential abhängig,

dann steigt in der aeroben Titration der Reduktionsgrad ab diesem Potential nicht mehr so rasch an wie bei einer fortgesetzt exponentiellen Steigung der Reduktionsgeschwindigkeit. Die sigmoide Titrationskurve der linearen Auftragung wird symmetrischer, die flach gegen negative Werte $\log \text{ox/red}$ auslaufende Kurve der halblog. Darstellung geht in eine steilere Gerade über. Dies findet sich sowohl bei den Reduktase- als auch bei den Cyt. b_5 -Redox-titrationsen bei sehr kleiner Reduktase-Konzentration. Diese Darstellung gilt vor allem das Verhalten der Reduktase, die an das $E_{L/P}$ enger gekoppelt ist als das Cyt. b_5 , nämlich direkt über das freie NADH. Das prinzipiell gleichartige Verhalten des Cyt. b_5 ist insoweit komplizierter, als es an das $E_{L/P}$ nur über das Flavinpotential gekoppelt ist.

6.6

Die kinetischen Parameter und das Reaktionsmodell der isolierten Cyt. b_5 -Reduktase-Reaktion

OKUDA, MIHARA und SATO (1972) massen für die Reaktion lys-Reduktase + try- b_5 eine $K_M(b_5)$ von 3.5 μM . SPATZ und STRITTMATTER (1973) gaben folgende Werte an:

	$K_M(\text{NADH})$	$K_M(b_5)$	$v_{\max}(\text{NADH})$	$v_{\max}(b_5)$
lys-Reduktase	2.5 μM	20 μM	29.000 min^{-1}	29.000 min^{-1}
det-Reduktase	6	45	23.000	6.800

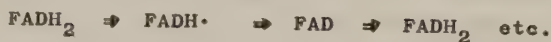
Die Reaktion wurde mit try- b_5 gemessen, der turnover zu b_5 wurde auf NADH-Umsatz bezogen.

Nach PANFILI, SOTTOCASA und BERNHARD (1971) ist die K_M der det-Reduktase zu det- b_5 ebenfalls 20 μM .

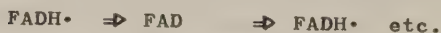
ESTABROOK und SMUCKLER (1973) warnen vor unkritischem Gebrauch des K_M -Wertes eines komplizierten Enzym-Systems, sei es in vivo oder in vitro, da sie vom geschwindigkeitsbestimmenden Schritt abhängt. Aus diesem Grund sollten die K_M der Cyt. b_5 -Reaktionen nur unter streng anaeroben Bedingungen gemessen werden, worauf bisher nicht geachtet wurde.

Wir finden unter anaeroben Bedingungen eine K_M der lys-Reduktase zu try- b_5 von rund 25 μM . Über die K_M im System det-Reduktase/det- b_5 lassen sich Schlüsse ziehen aus der Abhängigkeit des E_a von der det- b_5 -Konzentration bei den aeroben Redox-Titrationen. Das scheinbare Mittelpotential ist bei kleinen Cyt. b_5 -Konzentrationen ebenso gross wie im System lys-Reduktase try- b_5 , wird aber bei steigender Cyt. b_5 -Konzentration negativer als jenes. Da die Autoxidationsgeschwindigkeit beider Cyt. b_5 -Spezies ebenso schnell ist (0.6 nMol O_2 /min/nMol b_5) bedeutet dies einen vergleichsweise geringeren Zufluss reduzierender Äquivalente im Detergens-isolierten System bei steigender Cyt. b_5 -Konzentration als im Proteasen-isolierten System. Dieser geringere Zufluss kann nun auf einer geringeren v_{max} , einer grösseren K_M oder beidem gleichzeitig beruhen. Letzteres gaben SPATZ und STRITTMATTER (1973) für die Reaktion det-Reduktase/try- b_5 an.

Für die Reaktion des reduzierten Flavins mit dem Cytochrom ergeben sich drei Möglichkeiten:
Reaktionszyklus des Flavins zwischen voll reduzierter und voll oxidiert Form



oder unvollständige Oxidation bzw. Reduktion:



(Nach HEMMERICH, NAGELSCHNEIDER und VEEGER, 1976, sowie DIXON, 1970)

Das Fehlen eines Semichinon-Spektrums während der Reaktion zeigt, dass die steady-state-Konzentration des im Zyklus auftretenden Semichinons sehr gering ist. STRITTMATTER (1966) postuliert einen vollständigen Reaktionszyklus $FADH_2 \rightleftharpoons FAD$ während der Cyt. b_5 -Reduktion mit zwei unterscheidbaren Ein-Elektron-Schritten, beide schneller als die Flavin-Reduktion. NAD soll

während der gesamten Reaktion an das Flavin gebunden bleiben, da er bei Reaktionen mit NAD-Analogen gemessen hatte, dass ohne Zugabe von NAD die Oxidation des reduzierten Komplexes langsamer ist. ROGERS und STRITTMATTER (1974) geben ebenfalls einen Mechanismus der Cyt.b₅-Reduktase-Reaktion wider, wobei NAD während der gesamten Reaktion an FAD gebunden ist, aber als letzter Reaktionsschritt mit vernachlässigbar hoher Geschwindigkeit wieder abgespalten wird. Die mitgeteilte steady-state-Gleichung ist analog der in 4.1.2.3, wobei hier aber NAD sofort abgespalten wird. Gegen die NAD-Bindung während des gesamten Reaktionszyklus sprechen die in 4.1.2 angestellten Überlegungen, vor allem, da dann die Nernst-Gleichung für die L/P-Titrationsen nicht gültig wäre. Ausserdem ist eine Ursache für diesen ausserordentlich grossen Unterschied der Dissoziationskonstanten des FAD-NAD und FADH₂-NAD nicht ersichtlich. ROGERS und STRITTMATTER (1973) und ROGERS und STRITTMATTER (1974) massen bei einem Verhältnis b₅/b₅-Reduktase = 13 (Verhältnis wie in Mikrosomen) bei 20°C die Reaktionsgeschwindigkeiten der Cyt.b₅-Reaktion und berechneten durch Extrapolation von 2 auf 25°C (Faktor 2.5/10⁰C): k₃ = 420 sec⁻¹, k₅ = 3000 sec⁻¹, k₇ = 1.200 M⁻¹·sec⁻¹. Diese Konstanten ergeben in der gleichzeitig mitgeteilten steady-state-Gleichung eine K_M der Reduktase zu Cyt.b₅ von etwa 0.5 M (Molar!), denn

$$K_M(b_5) = \frac{k_3(k_5 + k_7)}{k_5 \cdot k_7}$$

Sie selbst geben aber eine gemessene K_M(b₅) von 20 µM an und rechnen damit. Die Formel der Reaktionsgeschwindigkeit zusammen mit den Michaeliskonstanten ziehen

aber eine untere Grenze der Grösse der Geschwindigkeitskonstanten. Diese untere Grenze liegt für k_5 und k_7 bei 10^6 (sec^{-1}).

6.7

Zur Aussagefähigkeit der Simulation

Die Simulation ist ein Modell von Flüssen, dessen Parameter aus kinetischen Messungen extrapoliert sind. Die kinetischen Daten sind jedoch begrenzt, die Aussagefähigkeit des simulierten Reaktionsmodelles wird also mit steigender Komplexität problematischer. Das einfachste Modell ist daher das beste. Wenn die Zwischenverbindungen des Modells in ihrem kinetischen Verhalten nicht experimentell beobachtet werden können, lässt die Simulation meist keine positive Unterscheidung zwischen den Details verschiedener Mechanismen mehr zu, wohl aber können negative Aussagen getroffen, d.h. unstimmmige Modelle als solche erkannt werden. Im Falle der Reduktase, bei der das Verhalten des Intermediats FADH_2 bestimmt werden kann, bedeutet dies, dass die Übereinstimmung zwischen experimenteller und simulierter L/P-Titration nicht unbedingt zwingend für ein bestimmtes Detail des Modells der Reduktasereaktion spricht. Die gute Übereinstimmung des simulierten Modelles mit den experimentellen Daten lässt erwarten, dass auch das simulierte Verhalten einer nicht experimentell beobachtbaren Grösse, etwa die steady state-Konzentration an freiem NADH oder LDH-NADH-Pyr-Komplex, das wirkliche Verhalten im Experiment wiedergibt.

6.8

Die Bedeutung des Autoxidationsflusses und der Redox-Zustand des Cyt. b_5 in vitro und in vivo

Die Verschiebung des scheinbaren Cyt. b_5 -Mittelpotentials in vitro bei aerober Lac/Pyr-Titration ist nicht

an grosse Flüsse gebunden. Die Simulation zeigt, dass bei Cyt.b₅-Titration mit 0.7 μM b₅, 0.07 μM Reduktase, 1 mM NAD, 1 μM LDH ein durchschnittlicher Fluss an URED von 0.4 $\mu\text{M}/\text{min}$, also 0.2 μM NADH/min auftritt und dass dabei das E_a des Cyt.b₅ bei - 135 mV liegt (Diese b₅- und Reduktasekonzentrationen liegen etwa in 1.5 mg Mikrosomen/ml vor). Man muss dabei bedenken, dass die eingesetzten Enzymkonzentrationen unter Sättigungsbedingungen (also v_{max}) den Umsatz von 2 mM NADH/min im Fall der b₅-Reduktase bzw. 21 mM NADH im Falle der LDH katalysieren können. Die auftretenden Flüsse liegen z.T. an der polarographischen Nachweisgrenze des Sauerstoffs und auch innerhalb des Fehlers der Substratbestimmung von Lactat und Pyruvat, so dass am Titrationsende keine Lactatabnahme beobachtet werden konnte. Aus diesem Grunde ist die Potentialverschiebung im Redoxpuffer Lac/Pyr kaum messbar und die Redox titrationen sind weitgehend reversibel. Die K_M-Werte der Reduktase und des Cyt.b₅ zum Sauerstoff liegen so niedrig, dass sie selbst bei Evakuieren und Begasen mit Stickstoff praktisch mit O₂ gesättigt sind. Daher sollte bei allen Gleichgewichtsmessungen ein etwaiger Autoxidationsfluss in Betracht gezogen werden.

Das Cyt.b₅-System ist also im Gegenwart von Sauerstoff ein offenes System und der Fluss bedingt ein Potentialgefälle entlang der Redoxkette. Je nach Konzentration der Glieder der Redoxkette verschiebt sich etwas der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Redoxkette und damit die einzelnen Potentialdifferenzen entlang dieses Gefälles. Geht man aber fälschlich von einem thermodynamischen Gleichgewicht aus, so erscheinen die Mittelpotentiale der einzelnen Glieder entlang der Redoxkette immer mehr zum negativen Potential verschoben. Diese Verschiebung ist also

ein Indikator des Potentialgefälles.

Die Autoxidation der Mikrosomen mit NADH beträgt ca. 3 - 4 nMol O_2 /mg/min. Dazu tragen nach Messungen an isolierten Substanzen das Cyt. b_5 etwa 0.4 nMol und die b_5 -Reduktase 0.2 nMol/min/mg bei, beide insgesamt also höchstens 0.6 nMol/mg/min. Wegen des Übergangs reduzierender Äquivalente auf die NADPH-Cyt.c-Reduktase und Cyt. P_{450} verstärkt sich also der Autoxidationsfluss gegenüber dem isolierten b_5 -System. Auch weitere, noch nicht definierte Flavoproteine der Mikrosomen könnten dazu beitragen (ESTABROOK und COHEN, 1973). Führt man aerobe Redox-titrations von Mikrosomen durch mit Konzentrations-verhältnisses, wie sie der Zelle entsprechen (3 μ M LDH, 0.5 mM NAD, 4 mg Mikrosomen/ml), so ergibt sich ein scheinbares Mittelpotential des Cyt. b_5 von - 173 mV, d.h. bei L/P = 1 ist b_5 zu etwa 70% reduziert, bei L/P = 10 zu 100%. Bei einem L/P = 1 (Reduktionsgrad des Cyt. b_5 70%) ist der Autoxidationsfluss aber nur noch 30 - 40% (1 - 1.5 nMol O_2 /mg/min) desjenigen bei NADH-Sättigung, was darauf hinweist, dass jetzt der Übergang reduzierender Äquivalente zum Cyt. P_{450} -System im Verhältnis zur NADH- b_5 -Reduktion langsamer ist als bei hohen NADH-Konzentrationen.

Nach SCHOLZ und BÜCHER (1965) ist das Cyt. b_5 in vivo nach Messung an perfundierter Rattenleber immer gleich reduziert bis zu einem L/P des Perfusats von 0.1. Eine Oxidation lässt sich nur erreichen bei Ferri-cyanid- und Menadionperfusion. Die Wirkung dieser Substanzen besteht in einer Flussverstärkung, wobei Elektronen von der Reduktase (Menadion, FeCy) und vom Cyt. b_5 (Menadion) schneller abgezogen werden als sie von NADH- und NADPH-System nachgeliefert werden. Der Unterschied des Verhaltens der Mikrosomen in vivo

und in vitro liegt in der Kopplung des Cyt. b_5 an sowohl das NADH wie auch das NADPH-System. L/P-Titrationsen von Mikrosomen in Gegenwart von NADPH zeigen die nur geringe b_5 -Oxidation trotz grosser L/P-Erniedrigung. Das Potential des cytosolischen NADPH/NADP in vivo ist mindestens 50 mV negativer als das NADH-Potential (BÜCHER 1970), die Konzentration des NADP-Systems ist allerdings geringer als die des NAD-Systems. In Abwesenheit des NADPH genügt die Versechsfachung des Autoxidationsflusses im isolierten System und in Mikrosomen (etwa durch Zugabe von 2-Hydroxy-Östradiol, siehe 5.3.1), um den Reduktionsgrad des b_5 um 50% zu senken.

Das mikrosomale Cyt. b_5 steht also in vivo wegen des NADPH-Puffers und des Potentialgefälles bedingt durch den Autoxidationsfluss mit dem NADH-System nicht im Gleichgewicht.

Die Autoxidation kann als eine Basisreaktion betrachtet werden, die nur abhängig vom Reduktionsgrad des Substrates permanent abläuft. Die Autoxidation ist also in gewissem Sinne eine dauernde 'Entkopplung' des mikrosomalen Elektronenflusses, und führt zu einer Abzweigung von reduzierenden Äquivalenten aus dem metabolischen Geschehen (weitere Entkopplungen, siehe unten). Sind die Maximalgeschwindigkeiten der anderen b_5 -abhängigen Stoffwechselwege auch grösser (3 - 10 nMol NADH/min/nMol b_5), so kommt doch in vivo der Autoxidation aufgrund der kleinen K_M und hohen Sauerstoffkonzentration gegenüber den geringen physiologischen Konzentrationen der anderen Substrate quantitativ die grösste Bedeutung zu. In vivo ist nach SCHOLZ und THURMAN (1969) der Sauerstoffverbrauch der hämoglobinfrei

perfundierten Rattenleber 1.5 $\mu\text{Mol O}_2/\text{min/g}$ Frischgewicht bei 38°C , davon sind 80% Cyanid-hemmbar (hierunter fällt auch die Desaturase-Aktivität des Cyt.b_5). Der Gehalt der Leber an Mikrosomen ist 10 - 20 mg/g Frischgewicht. Bei einem Lac/Pyr-Verhältnis in der Leber von 10 (s.u.) ist das mikrosomale Cyt.b_5 vollständig reduziert bei maximalem Autoxidationsfluss. Es stehen pro g Leber also einer nicht cyanidhemmbaren Atmung von 300 nMol O_2/min (38°C) einer mikrosomalen Autoxidation von etwa 50 nMol O_2/min (25°C) gegenüber. Bei Angleichung der Temperaturen (empirischer Faktor $2.5/10^\circ\text{C}$) ergibt sich 150 nMol O_2 mikrosomaler Autoxidation. Man kann also aufgrund dessen davon ausgehen, dass etwa 50% des nicht-mitochondrialen Sauerstoffumsatzes aus einer 'nutzlosen Wasserstoffvernichtung bzw. Wasserproduktion' allein der Mikrosomen besteht, d.h. ein Verlust reduzierender Äquivalente ohne Energiegewinn, also ein 'futile cycle' (NARASIMHULU, 1971).

6.9

Das Lac/Pyr-Potential als Redoxindikator des cytosolischen NADH/NAD-Potentials

Lactat und Pyruvat werden als wichtige Indikatoren des cytosolischen NADH/NAD-Potentials benutzt bei der hämoglobinfreien Perfusion der Rattenleber. Die Substrate permeieren die Zellmembran und es wird postuliert, dass sich zwischen extra- und intrazellulärem L/P-Verhältnis über die cytosolische LDH ein Gleichgewicht einstellt. Diese Gleichgewichtsforderung wird gestützt durch Messung der Metabolit-spiegel im Perfusat und Gewebsextrakt, wie auch durch fluoreszenzoptische Messungen des LDH-NADH-Komplexes in der Leber (SCHOLZ und BÜCHER 1965, BÜCHER 1970, SIES, TA, BRAUSER und BÜCHER 1971, BÜCHER, BRAUSER, CONZE, KLEIN, LANGGUTH und SIES 1972, BÜCHER und SIES

1975. Auf diese Literatur beziehen sich auch die im folgenden angegebenen Daten zum in vivo-Zustand des LDH- und NADH-Systems). Die L/P-Titrations an Mikrosomen und isoliertem System zeigen aber die Wirkung auch kleinster Flüsse in der Redoxkette auf das Ungleichgewicht der LDH-Reaktion. Hierbei ist die Richtung des Flusses unerheblich für die absolute Grösse der Potentialdifferenz. Bei Perfusionsexperimenten wird einmal über ein vorgegebenes Lactat/Pyruvat-Verhältnis im Perfusat versucht, das cytosolische NADH-Potential zu beeinflussen, andererseits lässt man im geschlossenen Perfusions-Kreislauf ein Lactat/Pyruvat-Potential sich aufbauen, das als Mass des cytosolischen NADH-Potentials benutzt wird. Bei gleicher absoluter Flussgrösse und ähnlichen Konzentrationen ist also die absolute Potentialdifferenz zwischen Lactat/Pyruvat und NADH/NAD gleich gross. Aufgrund der Perfusionsexperimente ist das Lac/Pyr-Verhältnis im Cytosol gleich 10. Die Konzentrationen NAD ist 0.5 mM, Lactat 4 - 8 mM, Pyruvat 0.1 - 0.8 mM, Oxalacetat 8 μ M, Malat 0.2 mM. Aus der Gleichgewichtskonstante der LDH-Reaktion, $K'_{eq} = 10^{-4}$ (38°C), errechnet sich für den Fall des thermodynamischen Gleichgewichts eine Konzentration an freiem NADH von rund 0.25 nMol/g Leber. Da in 1 g Leberzelle etwa 100 - 120 nMol NADH Bindungsstellen vorhanden sind, ist das Verhältnis des freien zu gebundenem NADH 1 : 100, denn das Mittelpotential des an LDH gebundenen NAD ist, wie sich aus den unterschiedlichen Dissoziationskonstanten von NADH und NAD ergibt, - 240 mV bei 25°C (siehe Simulation 4.2.2.1) bzw. 260 mV bei 38°C (siehe Literatur). Der LDH-Gehalt ist etwa 10 nMol b.s./g. Man kann also von folgenden in vivo-Bedingungen der LDH-Reaktion pro g Leber ausgehen:

Lac 8 mM - LDH 10 μ M - NAD 0.5 mM - 20 mg Mikro-Pyr 0.8 mM

somen (entsprechend 1 μ M Reduktase, 10 μ M Cyt.b₅).

Wie sich aus der Simulation ergibt, ist das gekoppelte LDH-Cyt.b₅-System zu komplex, um wie bei sehr einfachen Systemen die folgende Korrelation zwischen Fluss und Potentialabweichung vom Gleichgewicht analog dem Ohmschen Gesetz (BÜCHER und RÜSS-MANN 1963) aufzuweisen:

$$v_{st} = \frac{\Delta[A]_{st}}{\tau_{st}}$$

v_{st} der Fluss ('Stromstärke') im steady state

$\Delta[A]_{st}$ die Ablenkung der Substratkonzentration vom Gleichgewichtswert ('Spannung')

τ_{st} Relaxationszeit ('Widerstand')

In dieser Form gilt dieses Gesetz auch nur bei kleinen Auslenkungen aus dem Gleichgewicht, während die einzelnen Glieder der Redoxkette des Cyt.b₅-Systems vom Gleichgewichtspotential um Werte in der Grössenordnung $\frac{R \cdot T}{n \cdot F \cdot 2,3}$ (mV) abweichen. Daher können auf physiologische Bedingungen keine Gesetzmässigkeiten aus der Simulation heraus extrapoliert werden, es können nur exemplarische Angaben gegeben werden. Auch ist die Anwendung des Begriffs 'geschwindigkeitsbestimmender Schritt' nach der einfachen Vorstellung von KREBS und KORNBERG (1957) problematisch, nach welcher die Konzentration des 'Schrittmachersubstrats' ansteigt, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt. Im Cyt.b₅-System sind alle Abweichungen von den Gleichgewichtskonzentrationen gross und folgen diesem Verhalten des 'Schrittmacher-

substrates'. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt verteilt sich auf die gesamte Reaktionskette, welche als Ganzes gesehen werden muss. Als relativen 'geschwindigkeitsbestimmenden Schritt' kann man die Reaktion betrachten, zwischen dessen Substraten die grössere Potentialdifferenz besteht.

Die Simulation zeigt, dass im Autoxidations-steady-state das an LDH gebundene NADH sich stets mit dem $E_{L/P}$ im Gleichgewicht befindet, auch wenn das Potential des freien NADH um bis zu 100 mV davon abweicht. Das in vivo durch fluoreszenzphotometrische Methoden messbare LDH-NADH, das ja in 100-fachem Überschuss gegenüber dem nicht messbaren freiem NADH vorliegt und ausserdem eine doppelt so intensive Fluoreszenz aufweist, ist also kein Indikator für das eigentliche NADH-Potential, denn es befindet sich unter allen Flussbedingungen mit dem $E_{L/P}$ im Gleichgewicht, was nicht für das Potential des freien Nukleotids gilt. Bei dem zellulären Verhältnis $10 \mu\text{M LDH}/0.5 \text{ mM NAD}$ und jeder weiteren Vergrößerung dieses Verhältnisses durch Erhöhung der LDH-Konzentration bzw. Verminderung der NAD-Konzentration, welche das Potential des freien NADH noch mehr ins Gleichgewicht mit dem $E_{L/P}$ auch bei grösseren Flüssen setzt, liegt aber andererseits die Konzentration des freien NADH unter dem durchschnittlichen Wert der K_M der meisten NADH-abhängigen Dehydrogenasen und Reduktasen (um $5 \mu\text{M}$). Daher vermindert sich das Potentialgefälle zwar zwischen LDH-NADH und NADH, es wird aber erhöht zwischen NADH und dem Flavin, wie die Simulation der Cyt. b_5 -Titration zeigt (siehe 4.2.3). Das Potential am Cyt. b_5 ist bei $10 \mu\text{M LDH}/1 \text{ mM NAD}$ und bei $1 \mu\text{M LDH}/10 \text{ mM NAD}$ gleich (26 - 28 mV), während das NADH-Potential im ersten Fall 2.5 mV vom Gleichgewichtspotential ab-

weicht, im zweiten Fall 30 mV. Dieser Potentialunterschied des freien NADH von 30 mV ergibt allerdings in diesem speziellen Fall keinen Unterschied in der Konzentration wegen der Verzehnfachung der NAD-Konzentration.

BÜCHER und RÜSSMANN (1963) berechnen aufgrund von Relaxationsüberlegungen der isolierten LDH-Reaktion aus dem maximalen O_2 -Verbrauch der Leber (5 $\mu\text{Mol } O_2/\text{min/g Leber}$) als Anhaltspunkt für den Fluss durch die LDH, sowie aus der LDH-Aktivität (500 Units/g Leber bei 38°C) die Abweichung der LDH-Reaktion vom Gleichgewicht und geben eine maximale Differenz des NADH-Potentials vom $E_{L/P}$ mit 2 mV an. Die Simulation zeigt, dass bei $E_{L/P} = 150 \text{ mV}$, 10 μM LDH und 1 mM NAD ein Fluss von 3 μM NADH/min eine Abweichung des NADH-Potentials vom $E_{L/P}$ von 3 mV bedingt. Im Unterschied zu den simulierten Bedingungen besteht bei physiologischen Verhältnissen ein grösserer Fluss sowie eine geringere NAD-Konzentration bei um 90 mV negativerem $E_{L/P}$, so dass zu erwarten ist, dass im vivo die Abweichungen noch grösser sind.

6.10

Zum Mechanismus der Autoxidation

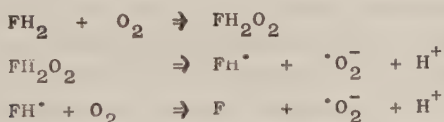
Während die Autoxidation des Cyt. b_5 zwar bekannt, aber nicht näher untersucht ist, beträgt nach STRITTMATTER (1957) die Autoxidation der Reduktase 0.03% der Ferricyanid-Aktivität, d.h. rund 1 nMol NADH/min/nMol Enzym. Demgegenüber gibt DIXON (1971) an, dass die Cyt. b_5 -Reduktase mit O_2 nicht reagiert, während die freien Flavine stark mit Sauerstoff reagieren, wobei die Geschwindigkeit im Bereich von Millisekunden liegt. Wir finden für die Autoxidation des Cyt. b_5 $v_{\text{max}} = 0.6 \text{ nMol } O_2/\text{min/nMol Cyt.}b_5$, $K_M = 7 \mu\text{M } O_2$ und für die der Reduktase $v_{\text{max}} = 3 \text{ nMol } O_2/\text{nMol Red.}/\text{min}$, $K_M = 11 \mu\text{M}$.

Das Flavin der Xanthin-Oxidase (FRIDOVICH 1971) redu-

ziert O_2 in Ein-Elektron-Schritten zum Peroxid-Radikal, das in H_2O_2 und O_2 disproportionieren kann (s.u.). Er stellt eine Korrelation zwischen dem Vorkommen einer Semichinon-Form und der Reaktion mit O_2 fest. Er vermutet, dass die meisten Flavine in gewissem Umfang neben 2 Elektronen auch 1 Elektron übertragen. Bei der Cyt.b₅-Reduktase ist eine Semichinon-Form photometrisch nicht nachzuweisen. HEMMERICH, NAGELSCHNEIDER und VEEGER (1970) bestreiten, dass die Semichinon-Form bei Angriff des reduzierten Flavins auf O_2 eine Rolle spielt. Sie schreiben es einem Flavohydrochinon zu, dessen stabile Endprodukte Flavin_{ox} und H_2O_2 sind

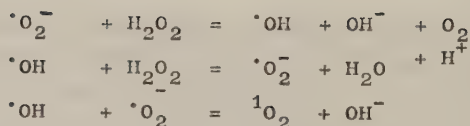


MILLER und RAPP (1973) sowie PEDERSON und AUST (1972) kamen bei der Studie der NADPH-abhängigen Oxidationen von Katecholen in Mikrosomen und an isolierter NADPH-Cyt.c-Reduktase zu dem Schluss, dass durch Reaktionen von O_2 mit reduzierter NADPH-Cyt.c-Reduktase und Cyt.P₄₅₀ Superoxid-Radikale entstehen nach



Die Superoxid-Radikale können folgendermassen reagieren

1. Reduktion in einem zweiten Ein-Elektronen-Schritt zu H_2O_2
2. Spontane Disproportionierung zu H_2O_2 und Singulett-Sauerstoff (1O_2), (KHAN 1970).
3. Nach HABER und WEISS (1934):



Unsere Messungen an der isolierten Cyt.b₅-Reduktase und Cyt.b₅ mit und ohne Katalase, sowie die NADH:O₂-Stöchiometrie zeigen, dass bei der Autoxidation H₂O₂ entsteht, welches aber weiter reagiert (siehe die peroxidatische Aktivität des Cyt.b₅-Systems). Während man für die Autoxidation des Cyt.b₅ eine sequentielle Ein-Elektron-Reduktion des Sauerstoffs über ein $\cdot\text{O}_2^-$ -Molekül in Betracht ziehen muss, kann für die Reduktase nach HEMMERICH, NAGELSCHNEIDER und VEEGER eine direkte Zwei-Elektronen-Reduktion zu H₂O₂ angenommen werden. Dies wird gestützt durch die unterschiedliche Reaktion des Cyt.b₅ und der Reduktase mit den untersuchten o-Diphenolen (s.u.).

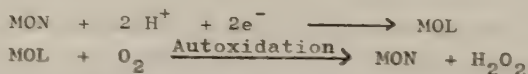
6.11

Die Reaktion des Cyt.b₅-Systems mit Menadion

NISHIBAYASHI-YAMASHITA und SATO (1970) massen die Oxidation von NADPH durch Menadion an Mikrosomen. IYANAGI und YAMAZAKI (1970) gaben die Reaktion von Menadion mit der mikrosomalen NADPH-Cyt.c-Reduktase und mit Cyt.b₅, nicht dagegen mit der NADH-Cyt.b₅-Reduktase an. Die Messungen an dem isolierten Cyt.b₅-System (5.1) zeigen jedoch, dass die isolierte Reduktase gegenüber der Kombination Reduktase/Cyt.b₅ (in Konzentrationsverhältnissen wie in Mikrosomen) schon 50% des NADH-abhängigen und 100% des NADPH-abhängigen Sauerstoffumsatzes ausmacht. Die geringe Reaktion der Reduktase mit NADPH bedingt also einen so geringen Fluss reduzierender Äquivalente, die schon auf der Stufe des Flavins zu 100% mit Menadion reagieren. Daher ist mit Cyt.b₅ keine Steigerung der Reaktion zu beobachten und das Cyt.b₅ ist zu 100% oxidiert. Demgegenüber bewirkt die Reaktion mit NADH

einen Fluss, der zu einem Sauerstoffumsatz führt, der schon auf Flavinstufe 30% grösser ist als mit NADPH und sich durch Cyt.b₅ verdoppelt. Die Maximalgeschwindigkeit der Menadionreaktion vom Sauerstoffverbrauch umgerechnet auf NADH-Umsatz beträgt bei Cyt.b₅ 10 nMol NADH/min/nMol Cyt.b₅, bei der Cyt.b₅-Reduktase 250 nMol NADH/min/nMol FAD. In Mikrosomen wird die NADH-abhängige Atmung gegenüber dem isolierten System nicht gesteigert und auch die Reduktionsgrade des Cyt.b₅ sind vergleichbar, ein Hinweis, dass jetzt der Fluss zum Menadion im Gegensatz zum viel geringeren Fluss bei Autoxidation zu gross ist, um Elektronen zum P₄₅₀-System übertreten zu lassen. Mit NADPH lässt sich die Menadion-Reaktion gegenüber dem isolierten Cyt.b₅-System steigern wegen der hohen 'NADPH-Menadion-Reduktase'-Aktivität des P₄₅₀-Systems. Der Cyt.b₅-Reduktionsgrad ist auch geringer als mit NADH, da Cyt.b₅ ja an das P₄₅₀-System weit weniger eng gekoppelt ist als an das NADH-System. Immerhin fließen aber noch Elektronen vom P₄₅₀- zum Cyt.b₅-System und erzeugen einen - im Vergleich zum NADH niedrigeren - steady state-Reduktionsgrad, im Gegensatz zum analogen NADH-Experiment, bei dem kein Fluss zum P₄₅₀-System hin auftrat. Da auch die mikrosomale Gesamtaktivität mit NADPH um 50% geringer ist als die mit NADH, muss also einerseits die P₄₅₀-Reduktase eine niedrigere 'Menadion-Reduktase'-Aktivität haben und ausserdem der Elektronenfluss vom P₄₅₀-System zum Cyt.b₅-System unter diesen Bedingungen langsamer sein als in umgekehrter Richtung (P₄₅₀-Reduktase liegt in Mikrosomen in der gleichen Konzentration vor wie die Cyt.b₅-Reduktase, 0.05 nMol/mg, errechnet aus den Daten bei OMURA und TAKESUE, 1970). Tatsächlich beträgt die 'Menadion-Reduktase'-Aktivität der P₄₅₀-Reduktase ca. 70 nMol NADH/min/nMol P₄₅₀-Reduktase und damit nur ca. 30% derjenigen der Cyt.b₅-Reduktase (errechnet aus den Daten bei IYANAGI und YAMAZAKI 1969).

Der Effekt des Menadion mit Sauerstoff und den reduzierenden Äquivalenten von NADPH bzw. NADH ist nach IYANAGI und YAMAZAKI (1979):

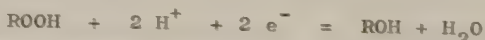


Diese Reaktion des Menadions wurde auch von NAKAMURA und YAMAZAKI (1972) an der Lipoamid-Dehydrogenase beobachtet. NICKERSON, FALCONE und STRAUSS (1963) gaben eine stöchiometrische Reaktion des Menadions mit Glutathion an. In unserem Falle reagierte Menadion nicht stöchiometrisch, sondern katalytisch. Nach der Reaktionsgleichung sollte 50% des verbrauchten Sauerstoffs nach Katalase-Zugabe regeneriert werden, wie es auch IYANAGI und YAMAZAKI (1969) an der isolierten P_{450} -Reduktase gemessen haben. Wir finden mit dem Cyt. b_5 -System nur etwa 30% O_2 -Regeneration, der Wert weist, wie bei der Cyt. b_5 -Autoxidation auf die peroxidatische Reaktion des Cyt. b_5 hin (s.u.).

6.12

Die peroxidatische Aktivität des Cyt. b_5

HRICAY und O'BRIAN (1973) entdeckten die Oxidation des NADH durch Cumolhydroperoxid in Rattenlebermikrosomen und definieren dies als Peroxidase-Aktivität

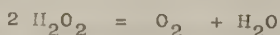


Die Reaktion war cyanidhemmbar. Sie zeigten die Beteiligung der NADH-Cyt. b_5 -Reduktase und des Cyt. P_{450} , schlossen aber eine Wirkung des Cyt. b_5 aus. Sie forderten einen direkten Elektronenübergang von der Cyt. b_5 -Reduktase zum Cyt. P_{450} . Die kinetischen Parameter der Reaktion wurden angegeben mit $K_M = 0.4 \text{ mM}$, $v_{\text{max}} = 81 \text{ nMol NADH/min/nMol Cyt.P}_{450}$. HRICAY und PROUGH (1974) massen an Mikrosomen eine Beteiligung des Cyt. b_5 an der NADH-abhängigen Reduktion von Cumol-Hydroperoxid. Sie forderten einen Elektronenübergang

vom Cyt.b₅ zum P₄₅₀ als dem eigentlichen Wirkort der peroxidatischen Reaktion und verneinen eine peroxidatische Aktivität des Cyt.b₅ selbst. SIES und GROSSKOPF (1975) berichteten die Oxidation von Cyt.b₅ durch Cumolhydroperoxid und t-Butylhydroperoxid in isolierten Hepatocyten, perfundierter Rattenleber und isolierten Mikrosomen. Der Mechanismus des Hydroperoxideffektes konnte nicht erklärt werden. Etwa 50% des eingesetzten Cumolperoxids sollten, vermutlich über eine radikalische Reaktion, zur Lipidperoxidation verbraucht werden. Daher wurde die peroxidatische Aktivität auf NADH-Verbrauch und nicht auf Produktbildung bezogen.

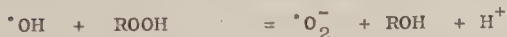
Wir finden am isolierten Cyt.b₅-System eine vermehrte NADH-Oxidation in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetzten Hydroperoxiden, und zwar in gleichem Ausmass für Cumol-, t-Butyl- und Wasserstoffperoxid, jeweils $K_M = 0.8 \text{ mM}$, $v_{\max} = 4 \text{ nMol NADH/min/nMol Cyt.b}_5$. Diese peroxidatische Aktivität kommt hauptsächlich dem Cyt.b₅ und nur in sehr geringem Umfang der Reduktase zu. Schon die Diskussion der Autoxidation und der Menadion-katalysierten Atmung zeigten eine Weiterreduktion des primär entstandenen H₂O₂. In Mikrosomen reagieren diese Hydroperoxide in der Reihenfolge ihrer Lipophilie mit zunehmender Geschwindigkeit (H₂O₂ < t-Butylperoxid < Cumolperoxid). Der Vergleich mit Mikrosomen, deren Cyt.P₄₅₀-Gehalt durch Luminal-Induktion gesteigert ist, zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des Cumolhydroperoxids vom P₄₅₀-Gehalt abhängt, wobei die kinetischen Parameter gut mit denen von HRYCAY und O'BRIAN (1973) angegebenen übereinstimmen. Im Gegensatz dazu hängen aber die Umsatzgeschwindigkeiten von t-Butylperoxid und H₂O₂ nicht vom P₄₅₀-Gehalt der Mikrosomen ab, und die K_M sind grösser. Der H₂O₂-Umsatz ist an Mikrosomen ebenso gross wie der des isolierten Cyt.b₅-

Systems in vergleichbaren Konzentrationen von Reduktase und Cyt.b₅. Die Reaktionsgeschwindigkeit am isolierten Cyt.b₅-System ist etwa 7% der mikrosomalen Cumoperoxid-Reduktion und reicht nicht aus, um den steady state-Reduktionsgrad des b₅ zu erniedrigen, solange die Reduktase und Cyt.b₅-Konzentrationen gleich den mikrosomalen sind. Erst bei starker Erniedrigung des Flusses durch Verminderung der Reduktasekonzentration lässt sich die Abhängigkeit des Cyt.b₅-Reduktionsgrades vom peroxidatischen Fluss zeigen. Im Gegensatz zu SIES und GROSSKOPF konnte eine Oxidation des mit NADH reduzierten Cyt.b₅ bei Zusatz von Cumolperoxid zu Mikrosomen nicht beobachtet werden. Dies lässt sich auf den geringen Fluss zurückführen, ist doch selbst bei dem 30-fach grösseren Menadion-katalysierten Fluss in Mikrosomen der b₅-Reduktionsgrad noch 55%. Die berichtete, erhebliche Cyt.b₅-Oxidation in der Leberzelle könnte ihre Erklärung finden in dem sehr viel niedrigeren Zufluss reduzierender Äquivalente bei dem physiologischen L/P von 10 gegenüber dem starken Fluss, wenn Mikrosomen in vitro mit NADH gesättigt werden. Ausserdem sollte man angesichts der vermutlich radikalischen Reaktion von 50% der eingesetzten Cumolperoxidmenge mit Lipiden (SIES und GROSSKOPF) eine evt. Minderung der Aktivität der Reduktasen in Betracht ziehen. Zur Frage des Mechanismus der peroxidatischen Aktivität des Cyt.b₅ lässt sich auf die Fähigkeit des Cyt.b₅ hinweisen, Superoxidradikale zu bilden, wie es durch die Untersuchung der Isoproterenol-Oxidation (s.u.) wahrscheinlich wird. Nach den ersten beiden Reaktionen des HABER-WEISS-Zyklus disproportioniert entstandenes H₂O₂ durch katalytische Wirkung von $\cdot\text{O}_2^-$



Vielleicht lässt sich für die organischen Peroxide

ein analoger Mechanismus formulieren:



Tatsächlich ist ja die Geschwindigkeit der peroxidatischen Reaktion mit $v_{\text{max}} = 4 \text{ nMol NADH/min/nMol } b_5$ nur wenig geringer als die der Reaktion mit Isoproterenol ($5 - 6 \text{ nMol NADH/min/nMol } b_5$).

6.13 Die Reaktion des Cyt. b_5 mit o-Diphenolen

Von MARKS und HECKER (1969) und BOLT und REMMER (1972) wurde die irreversible Bindung von Metaboliten mit o-Diphenol-Struktur in vivo und in vitro an Rattenlebermikrosomen untersucht. Nachdem von MCCORD und FRIDOVICH (1969) und MISRA und FRIDOVICH (1972) die Oxidation des Adrenalin als Nachweismethode für Superoxidradikale benutzt wurde, wurde auch durch Versuche mit DOPA, DOPAMIN, 2-Hydroxy-Östrogenen und Isoproterenol (WOLLENBERG et al. 1976, M.SCHEULEN 1975) die NADPH-abhängige Oxidation dieser Metabolite an Mikrosomen durch Superoxid-Radikale erklärt, die von der NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase gebildet werden.

6.13.1 2-Hydroxy-Östradiol-17 β

Dieses Östradiol-Derivat ist nach MARKS und HECKER (1969) ein Produkt des Östrogen-Abbaus, das in Mikrosomen vorwiegend durch Methylierung der 2-Hydroxy-Gruppe weiter metabolisiert wird. WOLLENBERG et al. (1975) fanden die Oxidation dieses o-Diphenols an der mikrosomalen NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase mit einer K_M von 0.03 mM und eine Hemmung der NADPH-abhängigen b_5 -Reduktion. Eine Geschwindigkeit der Östradiol-Oxidation wurde nicht angegeben. Wir finden am isolierten System eine Reaktion des Cyt. b_5 mit 2-Hydroxy-

Östradiol, der NADH-Verbrauch des Autoxidationsflusses wird etwa verzehnfacht und bei niedriger Reduktasekonzentration lässt sich die Oxidation des Cyt. b_5 beobachten. Die K_M dieser Reaktion steht mit 0.02 mM in guter Übereinstimmung mit dem von WOLLENBERG et al. für Mikrosomen angegebenen Wert. Der Fluss reicht nicht aus, um den NADH-abhängigen steady state-Reduktionsgrad des isolierten Cyt. b_5 zu verändern, solange die Konzentration an Reduktase in der Grössenordnung des normalen Gehaltes liegt. Die an Mikrosomen beobachtete Verminderung des NADPH-abhängigen b_5 -Reduktionsgrades resultiert nicht nur aus einem verminderten Zufluss reduzierender Äquivalente vom Cyt. P_{450} -System, wie vermutet wurde, sondern auch aus dem vermehrten Abfluss reduzierender Äquivalente, lässt sich doch bei L/P = 1 der NADH-abhängige b_5 -Reduktionsgrad im isolierten System mit 2-Hydroxy-Östradiol von 100% auf 45% senken.

6.13.2 Isoproterenol

An der isolierten NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase lässt sich - in Übereinstimmung mit den Befunden von SCHEULEN (1975) mit 2-Hydroxy-Östradiol - die NADPH-abhängige Oxidation des Isoproterenols zu N-Iso-propyl-Noradrenochrom (NINAC) messen, die durch die Bildung von Superoxidradikalen der NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase ermöglicht wird. Der maximale Fluss ist an Mikrosomen um etwa 6 - 10 nMol NADH/min/mg Protein grösser als an der isolierten NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase in entsprechender Konzentration wie in 1 mg Mikrosomen. Die stöchiometrische Untersuchung von Isoproterenol-Oxidation, NADPH- und O_2 -Verbrauch ergibt, dass in Mikrosomen wie an der isolierten NADPH-Cyt.c-Reduktase für die Oxidation von 1 Katechol zu 1 Chinon 1 Sauerstoffmolekül und 1 NADPH benötigt werden, was

für das in Frage kommende Superoxid-Radikal ebenso zutrifft wie für die im HABER-WEISS-Zyklus auftretenden weiteren 'aktiven' Sauerstoffspezies. Nach RAO und HAYON (1973) ist die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion

Katechol + $\cdot\text{O}_2^-$ + H^+ = H_2O_2 + Semichinonradikal
mit $8 \cdot 10^8 \text{ sec}^{-1} \text{ M}^{-1}$ sehr gross.

In Mikrosomen wird während dieser Oxidation des Katechols die NADPH-abhängige Reduktion des Cyt. b_5 gehemmt, der steady state-Reduktionsgrad des Cyt. b_5 wird gesenkt. Der zeitliche Verlauf der b_5 -Oxidation ist bemerkenswert: die Tatsache, dass das Maximum der Oxidation nicht zum Zeitpunkt des grössten Flusses zum Isoproterenol, sondern später, kurz vor der maximalen Konzentration des Oxidationsproduktes liegt, spricht gegen eine zu vereinfachte Vorstellung einer Hemmung der Cyt. b_5 -Reduktion aus Gründen eines verminderten Zuflusses von der P_{450} -Reduktase. Eher sollte man einen vermehrten Abfluss durch Reaktion des Cyt. b_5 mit einem Zwischenprodukt der Isoproterenol-Oxidation vermuten.

Eine Reaktion des Isoproterenols mit dem isolierten Cyt. b_5 -System lässt sich feststellen durch einen gesteigerten NADH-Verbrauch, die Cyt. b_5 -Reduktase ohne Cyt. b_5 hat keinen Effekt. Der NADH-Verbrauch wird in etwa demselben Mass gesteigert wie bei der Reaktion des Cyt. b_5 mit Hydroperoxiden und 2-Hydroxy-Östradiol. Dieser Fluss, $v_{\text{max}} = 5 - 6 \text{ nMol NADH/min/nMol b}_5$, ist ebenfalls zu gering um eine Cyt. b_5 -Oxidation zu bewirken, solange das Konzentrationsverhältnis Reduktase/Cyt b_5 dem der Mikrosomen entspricht. Die

Cyt. b_5 -Oxidation ist erst bei Verminderung der Reduktase-Konzentration sichtbar, wobei dann der Reduktionsgrad des Cyt. b_5 abfällt mit steigender Isoproterenol-Konzentration. Aber trotz dieser Feststellung einer Reaktion des Cyt. b_5 mit Isoproterenol wird kein Oxidationsprodukt beobachtet, es kommt also nicht zur Entstehung von NINAC. In Anoxie wird das Oxidationsprodukt NINAC wieder reduziert, sowohl durch die isolierte NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase, wobei 1 Mol NADPH mit 1 Mol Chinon reagiert unter Rückbildung des o-Diphenols, als auch - mit geringerer Geschwindigkeit - durch das isolierte P_{450} -System.

Ein Hinweis auf die Ursache des Fehlens eines Oxidationsproduktes ergibt sich aus der Tatsache, dass die Isoproterenol-Oxidation der isolierten NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase durch Zugabe des isolierten P_{450} -Systems mit NADH gehemmt wird, wobei die Geschwindigkeit der NINAC-Entstehung bedeutend stärker sinkt als die des O_2 -Verbrauches. Das Cyt. b_5 vermag also anscheinend das durch die P_{450} -Reduktase oxidierte Isoproterenol auf der Stufe eines Zwischenproduktes unter NADH-Verbrauch wieder zu reduzieren. Aus diesen Gründen kann die Reaktion des Cyt. b_5 mit Isoproterenol erklärt werden analog dem Verhalten der P_{450} -Reduktase durch die Bildung von Superoxid-Radikalen. Diese oxidieren das Diphenol in 1-Elektron-Schritten über das Semichinon, allerdings nicht bis zur Stufe des Chinons NINAC, denn gegenläufig reduziert gleichzeitig das Cyt. b_5 die entstehenden Oxidationsprodukte. Der NADH-Verbrauch der anaeroben NINAC-Reduktion des Cyt. b_5 ist auch etwa halb so gross wie der aerobe NADH-Umsatz mit Isoproterenol, so dass man ungefähr den Oxidationsfluss gleich dem Reduktionsfluss setzen kann, im Reaktionszyklus kommt es also nicht zur Entstehung von NINAC.

Da die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion mit Isoproterenol grösser ist als die Autoxidationsgeschwindigkeit, kann das gebildete $\cdot O_2^-$ nicht abgelöst vom Cyt. b_5 mit Substrat reagieren, sondern man muss einen Übergangszustand [Cyt. b_5 -Substrat- $\cdot O_2^-$] formulieren, der die Bildung von Peroxid-Radikal begünstigt.

Das weitgehende Fehlen einer Aktivität der Cyt. b_5 -Reduktase, die keine Semichinon-Form bildet wie die NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase, weist ebenfalls auf die Bedeutung der Ein-Elektron-Reduktion des Sauerstoffs hin.

Die Bildung von Superoxid-Radikalen ist möglicherweise auch die Ursache der peroxidatischen Aktivität des Cyt. b_5 im Gegensatz zur Cyt. b_5 -Reduktase (s.o.).

Der zeitliche Verlauf der Cyt. b_5 -Oxidation in Mikrosomen nach NADPH- und Isoproterenol-Zugabe ist also bedingt sowohl durch einen verminderten Zufluss reduzierender Äquivalente von der Cyt. P_{450} -Reduktase, wie auch durch einen erhöhten Abfluss vom Cyt. b_5 . Der sich nach 20 Minuten einstellende Reduktionsgrad des Cyt. b_5 verweist auf eine fortdauernde Reaktion mit NINAC.

6.14

Die Reaktionen des Cyt. b_5 als 'Entkopplungen des Elektronenflusses' und die Interaktion mit Cyt. P_{450}

Als 'Entkoppler' des mikrosomalen Elektronenflusses werden Substanzen definiert, die die O_2 -Aufnahme durch Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes stimulieren, aber keinen aktiven Sauerstoff-Einbau in das Substrat zulassen, sondern als Nettoreaktion nur die Reduktion des Sauerstoffs katalysieren. Eine durch Pharmaka induzierte Entkopplung des Elektronenflusses vom NADPH zum Cyt. P_{450} zeigte NARA-SIMHULU (1971) bei dem stimulierten NADPH- und O_2^-

Verbrauch der NADPH-Cyt. P_{450} -abhängigen C_{21} -Hydroxylase durch bestimmte Steroide, die zu vermehrter H_2O -Bildung ohne Entstehung eines hydroxylierten Substrates führte, sie nannte dies einen 'futile cycle'. Ebenso diskutierten WOLLENBERG, SCHEULEN, BOLT, KAPPUS und REMMER (1976) eine Entkopplung durch Wechselwirkung von verschiedenen Oxidationsstufen des 2-Hydroxy-Östradiols mit der NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase und Superoxid-Radikalen.

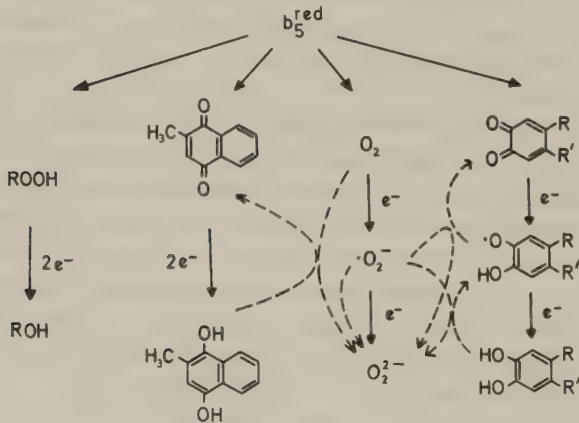


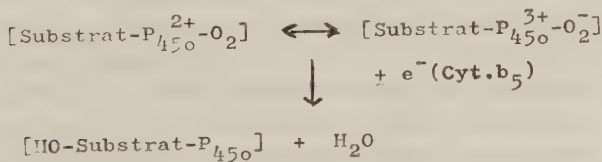
Abb. 95: Schematische Übersicht über die Cyt. b_5 -abhängigen Reduktionsreaktionen, sowie der Oxidation der Isoproterenol-Metaboliten durch $\cdot O_2$ und des Menadiol durch Sauerstoff.

Einschränkend muss bemerkt werden, dass WOLLENBERG et al. die Substratbildung nicht untersuchen konnten und es daher fraglich ist, ob diese Reaktion wirklich eine Entkopplung darstellt. Die Reaktion der NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase mit Isoproterenol wird man ebenfalls nicht als eine Entkopplung bezeichnen dürfen, da oxidiertes Substrat gebildet wird. Als Entkopplungsreaktionen des Cyt. b_5 -Systems kann

man anführen aufgrund der Untersuchung dieser Arbeit: die Reaktion mit Sauerstoff (Autoxidation), die Reaktion mit Menadion und die Reaktion mit Isoproterenol, vielleicht die mit 2-Hydroxy-Östradiol (das Produkt wurde nicht untersucht).

Als eine weitere Entkopplungsreaktion des Cyt. b_5 -Systems kann man die von STAUDT, LICHTENBERGER und ULLRICH (1974) diskutierte Reduktion des mikrosomalen [Cyt. P_{450} -Substrat- O_2^{2-}]-Komplexes durch Cyt. b_5 zu [Cyt. P_{450} -Substrat] und H_2O bezeichnen. Die Maximalgeschwindigkeit dieser Reaktion ist ca. 3 - 4 nMol NADH/min/mg Mikrosomen. Formal erinnert diese Reaktion an die peroxidatische Aktivität, die hier für das isolierte Cyt. b_5 gezeigt wurde, und auch der Fluss ist in dieser Größenordnung.

CORREIRA und MANNERING (1973) zeigten eine NADH-abhängige Reaktion des Cyt. b_5 mit dem Cyt. P_{450} bei der NADPH-abhängigen Hydroxylierung von 'Typ I-Substraten'. Diese Elektronendonorfunktion des Cyt. b_5 wurde als 'NADH-Synergismus' erstmals 1949 von MILLER und MUELLER diskutiert



Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion soll in der Reduktion mit Cyt. b_5 liegen ($v_{\text{max}} = 2 - 3$ nMol NADH/min/nMol b_5). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass GUNSALUS und LIPSCOMB (1972) das Mittelpotential des [Substrat- P_{450} - O_2]-Komplexes mit etwa ± 0 mV angeben, das damit in der Nähe des Cyt. b_5 -Potentials liegt, während das Mittelpotential des freien Cyt. P_{450} etwa - 300 mV beträgt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Rattenleber wurden isoliert und charakterisiert: Lactatdehydrogenase, Cyt.b₅ mit Trypsin, Cyt.b₅ mit Detergens, Cyt.b₅-Reduktase mit Lyso-somen, angereicherte Cyt.b₅-Reduktase mit Detergens.
2. Der Unterschied der Mittelpotentiale von Lactat/Pyruvat und NADH/NAD wurde bestimmt (25°C, 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.0) $\Delta E'_0 = 133 \text{ mV}$.
3. K_M und $v_{\max}$ der Reaktion lys-Reduktase/try-b₅ betragen: $K_M = 20 \text{ } \mu\text{M}$, $v_{\max} = 62.000 \text{ nMol b}_5/\text{min}/\text{nMol Reduktase}$. Aus der Abhängigkeit des 'scheinbaren Mittelpotentials' von der det-b₅-Konzentration folgt für die Reaktion det-Reduktase/det-Cyt.b₅ eine höhere K_M und niedrigere $v_{\max}$.
4. Für die Autoxidationen wurden folgende Eigenschaften gemessen:
 lys-Reduktase: $K_M = 11 \mu\text{M O}_2$, $v_{\max} = 3 \text{ nMol O}_2/\text{nMol Red/min}$
 try-, det-Cyt.b₅: $K_M = 7 \mu\text{M O}_2$, $v_{\max} = 0.6 \text{ nMol O}_2/\text{nMol b}_5/\text{min}$
 Mikrosomen mit NADH: $v_{\max} = 3 - 4 \text{ nMol O}_2/\text{min/mg Prot.}$
 NADH: $2 \cdot 10^{-3} \text{ nMol O}_2/\text{min/nMol NADH}$.
 Das bei der Autoxidation entstandene H₂O₂ wird weiter reduziert. Es kann gezeigt werden, dass sich in vivo 50% der nicht-mitochondrialen Atmung auf die mikrosomale Autoxidation zurückführen lassen.
5. Das Mittelpotential der lys-Reduktase wurde durch anaerobe Redoxtitration mit Lactat/Pyruvat und Malat/Oxalacetat bestimmt: $E'_0 = -108 \text{ mV}$, $n = 2$. Bei einem pH < 7 besteht keine pH-Abhängigkeit, bei einem pH > 7 ist sie - 60 mV/pH.
6. Das Mittelpotential des isolierten und des mikrosomalen Cyt.b₅ konnte mit Lactat/Pyruvat nicht bestimmt werden, da es positiver als - 70 mV ist. Durch potentiometrische Titration mit Ferricyanid und Dichionit wurde das des try-Cyt.b₅ auf + 6 mV bestimmt, $n = 1$ (25°C, pH 7.0, 0.1 M Puffer).

7. Die anaeroben Reduktionsgeschwindigkeiten wurden mit dem NADH-regenerierenden System gemessen. Sie sind bei niedrigen NADH-Konzentrationen (bis $5 \cdot 10^{-9} \text{M}$) linear vom $[\text{NADH}]$ abhängig. Diejenigen des mikrosomalen sind geringer als die des isolierten Cyt. b_5 -systems in gleichen Konzentrationsverhältnissen.
8. Redoxtitrationen des mikrosomalen und des isolierten Cyt. b_5 und der Cyt. b_5 -Reduktase in Gegenwart von Luftsauerstoff sind reversibel und zeigen stabile Reduktionsgrade. Die Titrationskurven sind in der graphischen Auftragung $E_{L/P}$ gegen $\log \text{ox/red}$ in guter Näherung linear, mit einer Steigung von ca. $10 \text{ mV}/\Delta \log \text{ox/red} = 1$ für das Cyt. b_5 bzw. $20 \text{ mV}/\Delta \log \text{ox/red} = 1$ für die Reduktase. Die scheinbaren Mittelpotentiale sind erheblich negativer als die Mittelpotentiale der anaeroben Titration. Die Abhängigkeiten der scheinbaren Mittelpotentiale von der LDH-, NAD-, Reduktase- und Cyt. b_5 -Konzentration und vom pH wurden bestimmt. Das scheinbare Mittelpotential des mikrosomalen Cyt. b_5 ist $E_a = -175 \text{mV}$, das des Proteasen-isolierten unter gleichen Konzentrationsbedingungen -135 mV .
9. Das kinetische Modell der LDH-Cyt. b_5 -Reaktion wurde aufgestellt und die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt. Als Modell wurde für die LDH-Reaktion der Ordered Bi Bi-Mechanismus gewählt, für die Cyt. b_5 -Reduktase-Reaktion ein Hexa Uni Ping Pong 'Döppelter Theorell-Chance'-Mechanismus. Die Autoxidationsmodelle mit ihren Geschwindigkeitskonstanten wurden ebenfalls untersucht.
10. Basierend auf dem Modell der LDH-Cyt. b_5 -Reaktion wurden die anaeroben und aeroben Redoxtitrationen des Cyt. b_5 -Systems am Computer simuliert. Die Ergebnisse zeigen: a) Die Abhängigkeit des 'scheinbaren Mittelpotentials' von den Konzentrationen der Komponenten der Redoxkette steht in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen, ebenso die anaeroben

Reduktionsgeschwindigkeiten. b) Die Form der Titrationskurve (in der Auftragung $E_{L/P}$ gegen $\log ox/red$) ist etwas stärker gekrümmt als im Experiment, sie kann verstanden werden aufgrund der potentialabhängigen Reduktionsgeschwindigkeit im Autoxidations-Fliessgleichgewicht.

c) Die geringen Flüsse der Autoxidation begründen die Abweichung des Cyt. b_5 -Systems vom Gleichgewicht. d) Unter den Bedingungen der Redoxtitration ist das Cyt. b_5 -System ein 'far from equilibrium'-System. Während das Potential des LDH-NADH-Komplexes unter allen Flussbedingungen gleich dem Lactat/Pyruvat-Potential ist, weichen die des freien NADH, der Cyt. b_5 -Reduktase und des Cyt. b_5 z.T. erheblich davon ab.

11. In vivo steht das mikrosomale Cyt. b_5 -System wegen des flussbedingten Potentialgefälles bei gleichzeitiger Pufferung durch das NADPH-System mit dem NADH-Potential nicht im Gleichgewicht.
12. Unter physiologischen Bedingungen ist eine Abweichung des Lactat/Pyruvat- vom NAD/NADH-Potential > 3 mV zu erwarten.
13. Das isolierte Cyt. b_5 hat peroxidatische Eigenschaften. Während Cumolhydroperoxid, t-Butylperoxid und H_2O_2 in Mikrosomen in der Reihenfolge ihrer Lipophilie zunehmend schnell reagieren, ist die Reaktion am isolierten Cyt. b_5 -System gleich, $v_{max} = 4$ nMol NADH/min/nMol Cyt. b_5 , $K_M = 0.8$ mM.
14. Menadion katalysiert am Cyt. b_5 -System NADH-abhängig die Reduktion von Sauerstoff zu H_2O_2 , dabei ist v_{max} der Cyt. b_5 -Reduktase 250 nMol NADH/min/nMol FAD, v_{max} des Cyt. b_5 10 nMol NADH/min/nMol b_5 . Die unterschiedlichen Flüsse von NADH und NADPH mit Menadion am isolierten System und an Mikrosomen werden verglichen und diskutiert.
15. Isoproterenol wird durch die NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase mit NADPH zu N-Isopropyl-Noradrenochrom oxidiert. Für diese Reaktion sind stöchiometrisch

2 Mol NADPH und 2 Mol O_2 für 1 Mol Isoproterenol nötig. Die Reaktion wird mit der Bildung von Superoxid-Radikalen durch die NADPH-Cyt. P_{450} -Reduktase erklärt. In Anoxie wird das Oxidationsprodukt NADPH-abhängig wieder reduziert mit der Stöchiometrie: 2 Mol NADPH/Mol N-Isopropyl-Noradenochrom.

16. Die o-Diphenole 2-Hydroxy-Östradiol und Isoproterenol steigern am isolierten Cyt. b_5 -System NADH- und Sauerstoff-Verbrauch. Ein Oxidationsprodukt des Isoproterenol kann nicht nachgewiesen werden. Das isolierte Cyt. b_5 -System hemmt die NADPH-abhängige Isoproterenol-Oxidation der Cyt. P_{450} -Reduktase. In Anoxie wird N-Isopropyl-Noradenochrom durch das Cyt. b_5 -System reduziert. Die Reaktion des Cyt. b_5 mit Isoproterenol wird erklärt als eine Entkopplung des Elektronenflusses durch Bildung von Superoxid-Radikalen am Cyt. b_5 , die Oxidation des Isoproterenols durch diese aktive Sauerstoffspezies und gleichzeitige Reduktion der Isoproterenolmetabolite durch Cyt. b_5 .

LITERATURVERZEICHNIS

- BARON J., HILDEBRANDT A.G., PETERSON J.A., ESTABROOK R.W.
(1973) in 'Microsomes and Drug Metabolism' (eds. ESTABROOK, GILLETTE, LEIBMAN), Vol 1, No. 1, p. 129
- BEISENHERZ G., BOLTZE H.J., BÜCHER Th., CZOK R.
GARBADE M.H., MEYER-ARENDT E. und PFLEIDERER G.,
(1953) Z. Naturforsch. 8 b, 555
- BOLT H.M., REMMER H.
(1972) Xenobiotica 2, 489
- BOYER P., THEORELL H.
(1956) Acta Chem. Scand., 10, 447
- BRAUSER B.
(1968) Z.f. Analyt. Chemie 237, 8
- BÜCHER Th., BRAUSER B., CONZE A., KLEIN F., LANGGUTH O.,
SIES H.
(1972) Eur. J. Biochem. 27, 301
- BÜCHER Th.,
(1970) in 'Pyridin Nucleotid-Dependent Dehydrogenases'
(ed. H. SUND) Springer Verlag, p. 439
- BÜCHER Th. SIES H.
(1975) in 'Regulation of Metabolism in Isolated Liver
Cells' (TAGAR, SÖLING, WILLIAMSON eds) ASP PRESS Amsterdam
- BÜCHER Th., RÜSSMANN W.
(1963) Angew. Chem. 75, 881
- BURTON K., WILSON T.H.
(1953) Biochem.J. 54, 86
- CASTELLINO N., BARKER C.
(1966) Biochem. 5, 1399
- CLELAND W.W.
(1963) Biochem. Biophys. Acta 67, 104, 173

- CORREIRA M.A., MANNERING G.J.
(1973) in 'Microsomes and Drug Oxidations' (eds. ESTABROOK, GILLETTE, LEIBMAN), Vol. 1, p. 139
- D'ANS-LAX
(1967) Taschenbuch für Chemiker und Physiker
Springer-Verlag, p. 1205
- DIXON M.
(1973) Biochem. Biophys. Acta 226, 269
- DUTTON P.L., WILSON D.F., LEE C.P.
(1970) Biochem. 9, 5077
- DUTTON P.L.
(1971) Biochem. Biophys. Acta 226, 63
- ESTABROOK R.W. COHEN B.
(1969) in 'Microsomes and Drug Oxidations' (eds. GILLETTE et al.) Academic Press New York, p.95
- FRIDOVICH I.
(1971) in 'Molecular Mechanism of oxygen activation'
(ed. HAYASHI) p. 61
- FROMM H.J.
(1975) 'Initial Rate Enzyme Kinetics' Springer Verlag.
- GARFINKEL D.
(1968) Comput. Biomed. Res. 2, 31
- GARFINKEL D.
(1956) Arch. Biochem. Biophys. 71, 111
- GEAR C.W.
(1971) Communications of the ACM 14, 176
- GUNSALUS J.C., LIPSCOMB J.B.
(1972) in 'Molecular Basis of Electron Transport'
Vol. IV, Miami, p. 149
- HABER F., WEISS J.
(1934) J. Proc. Roy. Soc., Ser. A, 147, 332
- HAKALA M.T. GLAID A.J., SCHWERT G.W.
(1956) J. Biol. Chem. 221, 191

- UEMMERICH P., NAGEL-SCHNEIDER G., VEEGER C.
(1970) FEBS Letters 8, 69
- HOLZER H., BUSCH D., KRÖGER H.
(1958) Z. Physiol. Chem. 313, 184
- HRYCAY E.G., O'BRIEN P.J.
(1973) Arch. Biochem. Biophys. 160, 230
- HRYCAY E.G., PROUGH R.A.
(1974) Arch. Biochem. Biophys. 165, 331
- ITO A., SATO R.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 4922
- IYANAGI I., YAMAZAKI I.
(1969) Biochem. Biophys. Acta 172, 137
- IYANAGI T., YAMAZAKI I.
(1970) Biochem. Biophys. Acta 267, 249
- IYANAGI T., MAKINO N., MASON H.S.
(1974) Biochem 13, 1701
- KAWAI Y., YONEIMA Y., YOSHIKAWA H.
(1963) Biochem. Biophys. Acta 67, 522
- KHAN A.V.
(1970) Science 168, 476
- KING E.L., ALTMAN C.,
(1956) J. Phys. Chem. 60, 1375
- KLINGENBERG M.,
(1958) Arch. Biochem. Biophys. 75, 376
- KREBS H., KORNBERG H.L.
(1957) Ergebn. Physiol. Biol. Chem.exp.Pharm. 49, 212
- KREBS H., VEECH R.
(1970) in 'Pyridin Nucleotid-Dependent Dehydrogenases'
(ed.H. SUND) Springer-Verlag, p. 352
- LAURENCE D.J.
(1951) Biochem. J. 51, 168
- MARKS F., HECKER E.
(1969) Biochem. Biophys. Acta 187, 250
- MAHLER H.R.
(1961) Proc. N.Y. Acad. Science, 92, 426

- MILLER J.A., MUELLER G.C.
(1949) J. Biol. Chem. 180, 1125
- MIHARA K., SATO R.
(1972) J. Biochem. 71, 725
- MILLER R.W., RAPP U.
(1973) J. Biol. Chem. 248, 6084
- MISRA H.P., FRIDOVICH I.
(1972) J. Biol. Chem. 247, 3170
- MISRA H.P., FRIDOVICH I.
(1976) Analytical Biochem. 70, 638
- MCCORD J.M., FRIDOVICH I.
(1969) J. Biol. Chem. 244, 6049
- NAKAMURA L., YAMAZAKI T.
(1972) Biochem. Biophys. Acta 267, 249
- NARASIMHULU S.,
(1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 384
- NETTER K.J.
(1972) Abstr. 5th Internat. Congr. Pharmacol., p.166
- NICKERSON H., FALCONE H., STRAUSS L.
(1963) Biochem. 2, 537
- NISHIBAYASHI-YAMASHITA S., SATO R.
(1970) J. Biochem. 67, 199
- OKUDA M., MIHARA K., SATO R.
(1972) J. Biochem. 72, 987
- OMURA T., SATO R.
(1964) J. Biochem. 239, 2370
- OMURA T., TAKESUE S.
(1970) J. Biochem. 67, 249
- OSHINO N., IMAI Y., SATO R.
(1970) J. Biochem. 69, 155
- OSHINO N., SATO R.
(1971) Biochem. 69, 169
- PANFILI E., SOTTOCASA G.L., De BERNARD B.
(1971) Biochem. Biophys. Acta 253, 323

- PEDERSON T.C., AUST S.D.
(1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 1071
- PFLEIDERER G., AURICCHIO F.
(1964) Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 53
- RAO R.S., HAYON E.
(1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 51, 468
- RAVAL D.N., WOLFE R.G.
(1962) Biochem. 1, 1112
- RODKEY F.L.
(1955) J. Biol. Chem. 213, 777
- ROGERS L., STRITTMATTER P.
(1973) J. Biol. Chem. 248, 800
- ROGERS L., STRITTMATTER P.
(1974) J. Biol. Chem. 249, 895
- SCATCHARD G.
(1949) Ann., N.Y. Acad. Sci. 51, 660
- SCHELLENBERG K.A., HELLERMANN L.
(1958) J. Biol. Chem. 231, 547
- SCHEULEN M.
(1975) Diplomarbeit Tübingen
- SCHLEYER M., COOPER D.Y., ROSENTHAL O.
(1973) in 'Oxidases and related redox-systems'
University Press Baltimore, p. 469
- SCHOLZ R., BÜCHER Th.
(1965) in 'Control of Energy Metabolism'
Academic Press, N.Y., p. 393
- SCHOLZ R., THURMAN R.G.
(1969) Europ. J. Biochem. 10, 459
- SIES H., GROSSKOPF M.
(1975) Europ. J. Biochem 57, 513
- SIES H., BRAUSER B.
(1970) Europ. J. Biochem 15, 531
- SIES H., TJIN TA S., BRAUSER B., BÜCHER Th.
(1971) in 'Advances in Enzyme Regulation'
Vol. X, (ed. G. Weber) Pergamon Press, p. 509

- SPATZ L., STRITTMATTER P.
(1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1042
- SPATZ L., STRITTMATTER P.
(1973) J. Biol. Chem. 248, 793
- STAUDT H., LICHTENBERGER F., ULLRICH V.
(1974) Eur. J. Biochem. 46, 99
- STERN R., OCHOA S., LYNEN F.
(1952) J. Biol. Chem. 198, 313
- STRITTMATTER P., VELICK S.F.
(1956) J. Biol. Chem. 221, 253
- STRITTMATTER P., VELICK S.F.
(1957) J. Biol. Chem. 228, 785
- STRITTMATTER P.
(1960) J. Biol. Chem. 235, 2492
- STRITTMATTER P.
(1961) in 'Haematin Enzymes' Vol. 19, p. 464, p. 477
- STRITTMATTER P.
(1966) in 'Flavins and Flavoproteins' (SLATER E.C. ed.)
Elsevir Amsterdam, p. 325
- STRITTMATTER P.
(1967) in 'Methods of Enzymologie' Vol. 10., p. 553
(ed. ESTABROOK R.W., PULLMAN H.E.) Academic Press, N.Y.
- TAKESUE S., OMURA T.
(1970) J. Biochem 67, 267
- TAKESUE S., OMURA T.
(1970) J. Biochem 67, 259
- URBAN P.F., KLINGENBERG M.
(1969) Europ. J. Biochem. 9, 519
- VAN GELDER B.F., SLATER E.C.
(1962) Biochem. Biophys. Acta 58, 593
- VELICK S.F.
(1958) J. Biol. Chem. 233, 1455

- VESTLING C.S., HSIEH W.T.
(1966) Biochem. Prepar. 11, 69
- VOLKENSTEIN M.V., GOLDSTEIN B.N.
(1966) Biochem. Biophys. Acta 115, 471
- WATERMAN M.R., MASON I.I.S
(1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 57
- WIELAND Th., PFLEIDERER G., ORTANDERL F.
(1959) Biochem. Z. 331, 103
- WILLIAMSON D.H., LUND P., KREBS H.A.
(1967) Biochem.J. 103, 514
- WEBER H., WEIS W., STAUDINGER H.J.
(1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1203
- WOLLENBERG P., SCHEULEN M., BOLT H.M., KAPPUS H.,
REMMER H.
(1976) Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 357, 351
- ZEWE V., FROMM H.J.
(1965) Biochem. 4, 783
- ZIEGENHORN J., SENN M., BÜCHER Th.
(1976) Clin. Chem. 22, 151

LEBENS LAUF

Am 8. Dezember 1946 wurde ich als Sohn des Landgerichtsdirektors Dr. Bernhard Hülsmann und Frau Traudl, geb. Sattler in Diez/Lahn geboren. Ich besuchte von 1953 bis 1957 die katholische Volksschule und von 1957 bis 1966 das Humanistische Görres-Gymnasium in Koblenz, wo ich das Abitur ablegte. Von 1966 bis 1968 studierte ich Medizin bis zum Physikum an der Universität des Saarlandes, anschliessend ab 1968 Chemie im Hauptfach an der Ludwig-Maximilian-Universität in München, wo ich im Februar 1975 die Diplomhauptprüfung vollständig bestand. Die Diplomarbeit ebenso wie die anschliessende Dissertation im Fachbereich Chemie wurden am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie, Leitung Prof. Dr. Th. Bücher, durchgeführt. 1975 erfolgte Staatsexamen und Promotion in Humanmedizin. Seit Oktober 1976 bin ich Vorkoordinator einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Pharmakologischen Institut der Universität München.

